UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1943-1944 N° 324

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PIGMENTS BILIAIRES EN COPROLOGIE

LEUR RECHERCHE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 24 Mai 1944

PAR

Georges NÉGREVERGNE

Interne des Hôpitaux

Né à BORDEAUX (Gironde), le 19 février 1917

Examinateurs de la Thèse

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président.*

CHELLE, professeur .....

WANGERMEZ, professeur ..... *Juges.*

MANDOUL, agrégé .....

BORDEAUX

IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS

6, Place Saint-Christoly

1944

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1943-1944 N° 324

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PIGMENTS BILIAIRES EN COPROLOGIE

LEUR RECHERCHE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 24 Mai 1944

PAR

Georges NÉGREVERGNE

Interne des Hôpitaux

Né à BORDEAUX (Gironde), le 19 février 1917

Examinateurs de la Thèse

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président.*

CHELLE, professeur .....

WANGERMEZ, professeur ..... *Juges.*

MANDOUL, agrégé .....

BORDEAUX

IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS

6, Place Saint-Christoly

1944

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.
ASSESSEUR : M. LABAT.
DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

M. DENIGÈS, BEILLE, G. SIGALAS, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ABADIE, ROCHER, LANDE, DUVERGEY.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurg. et gynécol.	JEANNENEY.	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. inf. et orthop.	LOUBAT.
Pathologie et thérapeutique gén.	CARLES.	Clin. des maladies infectieuses	DAMADE.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.	Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Anatomie pathol. et microsc. clin.	DE GRAILLY.	Physique méd. et pharmaceutique.	WANGERMEZ.
Anatomie	VILLEMIN.	Méd. col. et clin. mal. exotiques.	BONNIN.
Anatomie générale et histologie.	G. DUBREUIL.	Clin. malad. cutanées et syphilit.	JOULIA.
Hygiène	LEURET.	Clin. des mal. des voies urinaires.	DARGET.
Médecine légale et déontologie	DERVILLÉE.	Clin. mal. nerveuses et mentales.	DELMAS-MARSALET.
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	RÉCHOU.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée.	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Hydrologie thérap. et climatol.	CREYX.
Pharmacie	VITTE	Clinique odonto-stomatologique.	DUBECQ.
Physiologie	FABRE.		

MM. LACOSTE (Histologie). PÉRY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). CHARRIER (Chirurgie générale). FAUGÈRE (Obstétrique).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	POUYANNE.
Physiologie	FRANCK.	Obstétrique	N.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	id.	MAHON.
id.	N.	Ophtalmologie	N.
id.	FONTAN.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	BROUSTET.	Dermatologie et syphiligraphie	N...
id.	N.	Physique médicale	N...
id.	SARIC.	Chimie gén. pharm. et toxicol.	CASTAGNOU.
id.	DUBARRY.	Histoire natur. pharmaceutique	GIRARD.
Chirurgie générale	N.	Pharmacie	MESNARD.
id.	MASSÉ.	id.	GRANGER.
id.	N.	Histoire natur. méd. et parasitol.	R. MANDOUL.
id.	MAGENDIE.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	N...	Anatomie	J. BEAUVIEUX
Accouchements	MAHON.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Puériculture	FAUGÈRE.	Botanique	GIRARD.
Zoologie et parasitologie	R. MANDOUL.	Cryptogamie	GIRARD.
Médecine légale	N.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Urologie	N...	Bactériologie	MOUREAU.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Physiologie	N...
Ophtalmologie	N.	Chimie biologique	TAYEAU

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MA GRAND-MERE

A MA MERE — A MON PERE

A MA FEMME

A MA SŒUR — A MES FRERES

A MES BELLES-SŒURS — A MON BEAU-FRERE

A MES BEAUX-PARENTS

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MES CAMARADES DE L'INTERNAT
ET DU LABORATOIRE DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE
DE LA FACULTE

A MON MAITRE DE STAGE

MONSIEUR G. CATOR

Pharmacien,
Ex-interne des Hôpitaux de Paris.

A MONSIEUR BASSET

Pharmacien des Hôpitaux,
Ex-chef de Travaux pratiques à la Faculté.

A MES MAITRES
DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX

A Monsieur le Professeur agrégé R. CASTAGNOU.

A Monsieur le Professeur agrégé R. MANDOUL.

A Monsieur le Professeur WANGERMEZ

Professeur de Physique médicale et pharmaceutique,
Radiologiste des Hôpitaux,
Sous-Directeur du Centre régional de lutte contre le cancer
de Bordeaux et du Sud-Oues,
Officier d'Académie.

A Monsieur le Professeur G. VITTE

Professeur de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux,
Officier d'Académie.

A Monsieur le Professeur A. LABAT

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène appliquée,
Pharmacien chef des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.

A Monsieur le Professeur L. CHELLE

Professeur de chimie,
Membre correspondant de l'Académie de Médecine,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. SIGALAS

Professeur de Zoologie et de Parasitologie,
Directeur du Laboratoire maritime
de l'Ecole des Hautes Etudes de Paris,
Directeur de la Station biologique d'Arcachon,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

AVANT-PROPOS

Témoigner notre reconnaissance à ceux qui nous ont aidé à la réalisation de ce travail, est certainement le devoir le plus agréable à remplir avant de présenter cette thèse.

Nos camarades Grillet, Hernette, Lintilhac et notre beau-frère, P.-H. Chamaillard, agrégé de l'Université, nous ont facilité les traductions d'articles étrangers. Nous les en remercions vivement.

M. Tayeau a mis sa bibliothèque à notre disposition. Nous le prions de recevoir nos remerciements.

Nous ne saurions manquer d'adresser à M. le Docteur Servantie, biologiste des hôpitaux, toute notre gratitude pour l'aimable accueil qu'il nous a fait dans son laboratoire.

M. le Professeur agrégé R. Castagnou, qui nous a toujours donné de judicieuses directives, trouvera ici l'expression de toute notre respectueuse sympathie.

C'est grâce à l'amabilité de M. le Professeur Wangermez que nous avons pu mener à bien la partie physique de ce travail. Nous lui présentons l'expression de notre bien vive reconnaissance, ainsi qu'à M. le Docteur Castebert, son chef de travaux, qui nous a permis d'obtenir les photographies de spectres.

Nous avons fait nos études au Laboratoire de zoologie et parasitologie, où nous avons passé nos meilleures années d'étudiant parmi d'excellents camarades. Nous pensons tout particulièrement à notre ami R. Pautrizel, assistant, qui nous a si aimablement guidé dans nos recherches.

M. le Professeur agrégé R. Mandoul n'a jamais manqué de nous fournir son aide compétente pour la bibliographie, la

rédaction ou la critique de notre thèse. Nous lui devons le meilleur de notre travail. Nous voulons lui témoigner ici notre profonde gratitude.

Mais nous sommes particulièrement heureux de pouvoir, aujourd'hui, dédier notre thèse à M. le Professeur R. Sigalas, qui nous a, avec tant de bienveillance, accueilli dans son laboratoire. Nous lui adressons nos sentiments d'affectueuse reconnaissance.

Bordeaux, le 22 avril 1944.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DES

PIGMENTS BILIAIRES

EN COPROLOGIE

LEUR RECHERCHE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

INTRODUCTION

L'investigation coprologique, qui permet d'assurer l'exploration fonctionnelle du tube digestif et de ses glandes annexes, est demeurée pendant longtemps l'apanage d'un petit nombre de spécialistes. Sa complexité, son caractère parfois un peu répugnant, ont rebuté bien des chercheurs; cependant, dans ces dernières années, cette science a réalisé de notables progrès, et prend actuellement un développement considérable. Elle apporte à la clinique, par les examens cytologiques, bactériologiques, parasitologiques et chimiques, des renseignements extrêmement précieux et capables d'éclairer la séméiologie et la pathogénie d'un grand nombre d'affections gastro-intestinales. L'examen coprologique a donc pris en clinique, de nos jours, la place qui lui revient à côté de l'analyse du sang et des urines. Nous avons cherché dans notre travail inaugural à apporter une contri-

bution à l'analyse des matières fécales dans ses applications cliniques, sur le plan chimique. Ce travail porte sur l'étude des pigments biliaires en coprologie. Au cours de nombreux examens chimiques des selles, nous avons été frappé par la difficulté d'interprétation et la lenteur des divers procédés classique de recherche qualitative des pigments biliaires. Nous nous sommes efforcé d'établir une technique plus rapide et plus précise. Nous avons constaté, d'autre part, que les méthodes de dosage de ces pigments qui ont été proposées ne sont guère applicables à la pratique courante en raison de leur grande complexité. C'est, sans doute, une des raisons pour lesquelles les cliniciens attachent peu de valeur à ces dosages. Nous pensons qu'en possession d'une technique d'application clinique, des dosages systématiques et répétés présenteraient un intérêt séméiologique certain. C'est dans cet espoir que nous nous sommes attaché à mettre au point une technique de dosage des pigments biliaires plus simple que les procédés antérieurs.

Nous aurions aussi désiré apporter une méthode de dosage de la stercobiline. L'impossibilité momentanée de nous procurer ce pigment ne nous l'a pas permis. Nous nous sommes borné à rechercher celui de la bilirubine dans le méconium et les selles des nourrissons, mais nous nous réservons toutefois de compléter notre travail dès que possible. Nous avons aussi cherché à savoir si nos techniques coprologiques personnelles étaient susceptibles d'être appliquées à la recherche et au dosage des pigments biliaires dans les divers liquides organiques, et nous pouvons conclure par l'affirmative.

Voici le plan de notre travail :

Dans la première partie, nous avons résumé les principales études auxquelles la bilirubine a donné lieu au point de vue de sa genèse physiologique et chimique. Nous envisageons ensuite sa constitution, ses propriétés physico-chimiques et sa synthèse. Nous avons fait appel pour rédiger ce chapitre à des publications récentes, et, le plus souvent, d'origine étrangère.

Dans le deuxième chapitre, nous étudions les techniques courantes de recherche des pigments biliaires dans les selles d'après les publications originales de leurs auteurs; après avoir fait la critique de ces dernières, nous exposons les détails de notre méthode personnelle.

Nous avons consacré la troisième partie à l'étude comparative des techniques de dosage de la bilirubine dans les selles des nouveau-nés, techniques qui sont d'ailleurs toutes d'origine étrangère et de date récente pour la plupart. Nous en avons fait l'étude critique et nous décrivons ensuite les différents temps de la méthode de dosage que nous avons mise au point.

Nous avons enfin, en une vue d'ensemble, précisé nos conclusions.

CHAPITRE PREMIER

LA BILIRUBINE

La bilirubine est, chez les mammifères, le pigment biliaire principal, qui donne à la bile sa couleur jaune d'or. C'est un acide monobasique faible, qui se présente dans la sécrétion hépatique sous forme de sels de sodium. On admet à l'heure actuelle que le rôle physiologique de ce pigment est nul et on tend à le considérer comme un produit de déchet du métabolisme analogue à l'urée. Résidu des hématies détruites, il dérive par hydratation de l'hématine, qui elle-même provient de l'hémoglobine. Il est excrété à la quantité moyenne de 0,15 g. par vingt-quatre heures chez l'homme (fistule biliaire), ce qui correspond à la teneur en hémoglobine de 100 g. de sang. Le pigment biliaire est donc un excréta, comme l'urée. On attribue une partie de la toxicité de la bile à son action propre : chez le lapin, la bilirubine injectée par voie intraveineuse provoque la mort à la dose de 0,05 g. par kilogramme; chez l'homme, l'hyperbilirubinémie détermine l'hypothermie et des accidents convulsifs et paralytiques. Cependant, suivant la théorie classique du cycle entéro-hépatique, une partie de ce pigment est réabsorbée au niveau de l'intestin, pour être à nouveau utilisée par la glande hépatique (sécrétion excréto-récrémentielle), l'autre partie du pigment, au cours du transit intestinal, subit, sous l'action de la flore microbienne, des transformations successives, qui l'amènent au stade de stercobiline; c'est cette dernière qui confère aux selles leur coloration normale. Enfin, une très faible

quantité est éliminée par le rein sous forme d'urobiline. Chez l'adulte, l'apparition de la bilirubine dans les selles matérialise l'existence de troubles moteurs provoquant une accélération du transit intestinal. Par contre, dans le méconium des nouveau-nés et dans les selles des nourrissons, jusqu'au 7e mois environ, la bilirubine est retrouvée en nature, car, à ce moment, l'activité de la flore intestinale est nulle ou encore discrète.

Dans certains états pathologiques qui engendrent la lithiase biliaire, la bilirubine peut prendre part à la formation de calculs. Chez l'homme, les calculs de bilirubinate de calcium pur sont assez rares (10 p. 100). On rencontre plus fréquemment des calculs mixtes de cholestérol, de bilirubinate et de carbonate de calcium. Chez les bovidés, au contraire, les calculs de bilirubinate de calcium pur sont très fréquents.

R. Deschiens [1] a montré que la bilirubine possède une action stimulante sur les cultures d'amibes dysentériques, et explique ainsi le tropisme que ces protistes parasites manifestent fréquemment pour la glande hépatique.

P.-E. Morhard [2] a enfin signalé que le passage dans le sang du facteur K liposoluble serait dépendant de la présence des pigments biliaires dans l'intestin. Cette considération pose le problème, que l'avenir aura à résoudre, du rôle physiologique possible du pigment biliaire.

A. — Genèse du pigment biliaire.

L'étude du pigment biliaire a retenu l'attention de nombreux chercheurs tant en France qu'à l'étranger. Le problème de la genèse physiologique, en particulier, a donné lieu à de nombreuses controverses, et, à l'heure actuelle, plusieurs théories demeurent encore en présence, dont nous nous bornerons à présenter un résumé schématique sans entrer dans des discussions qui sortiraient du cadre pharmaceutique de ce travail.

I. — Genèse physiologique de la bilirubine.

En France, de nombreux cliniciens, physiologistes et histologistes, ont émis différentes hypothèses pour expliquer la biligénèse. Elles s'affrontent toutes autour de ce point crucial : le foie est-il un organe sécréteur du pigment ?

La plupart des physiologistes admettent l'opinion classique que les éléments de la bile ne préexistent pas dans le sang et que la bilirubine est formée par le foie. Des faits d'expérimentation et de physiologie comparative viennent à l'appui de cette opinion (E. et L. Hedon [3]). On sait d'autre part mettre en évidence dans le sang, grâce à la technique d'Hijmans van den Berg, deux bilirubines, l'une qui donne une azoréaction « directe », l'autre une azoréaction « indirecte ». Bien qu'on ait établi avec certitude qu'il s'agit d'un seul et même corps, certains auteurs ont pensé pouvoir attribuer à la bilirubine « directe » une origine hépatique, tandis que la bilirubine « indirecte » prendrait naissance dans le système réticulo-endothélial. Cependant Charonnat [1] a montré qu'en présence de sulfate de magnésium, la réaction de van den Berg ne permettait plus de faire aucune différence. E. Chabrol [4], en 1941, pratiquant l'épreuve de Eilbott et von Bergmann, a révélé l'existence d'une bilirubine de réserve, et a émis l'hypothèse, appuyée sur des expériences antérieures de N. Fiessinger et H. Bérard, du rôle sécréteur probable du parenchyme splénique, tout au moins à titre accessoire.

Pour N. Fiessinger, enfin, plusieurs organes ou tissus contribuent à la genèse de la bilirubine : 1° le foie, organe sécréteur et excréteur du pigment; 2° le système réticulo-endothélial : rate, moelle osseuse, cellules de Küppfer.

C'est à cette explication de la genèse du pigment que se rallient la majorité des auteurs.

Cependant certains histologistes ont émis des doutes sur le rôle sécréteur de la cellule hépatique vis-à-vis de la biliru-

(1) Charonnat, communication verbale.

bine. P. Florentin [5], dans sa thèse, s'appuyant sur de nombreux examens histologiques, a soutenu cette opinion que le siège de formation de la bilirubine ne peut être que :

a) le cytoplasme de grandes cellules telles que les cellules pigmentées de la pulpe rouge splénique, et à un degré plus faible celui des cellules de Küppfer; ces dernières seraient susceptibles d'augmenter leur activité génératrice au cours de certains états pathologiques;

b) le système circulatoire, où sa genèse s'opère aux dépens des hématies détruites.

Le rôle de la cellule hépatique se bornerait à une simple sécrétion du pigment préformé à l'état de biliverdine, et assurerait seulement sa réduction en bilirubine.

Notons enfin, pour terminer, qu'à titre accidentel la bilirubine peut prendre naissance dans les extravagats sanguins, les hématomes, où elle se présente sous forme de cristaux rouges qui ont été connus pendant longtemps sous le nom de cristaux d'hématoïdine.

II. — Genèse chimique de la bilirubine.

Le mécanisme chimique de la biligénèse a été particulièrement étudié durant ces dernières années. La bilirubine se forme aux dépens de l'hémoglobine d'après le schéma suivant donné par Künster :

$$\text{Hémoglobine} \rightarrow \text{globine} + \text{hématine}$$
$$\text{hématine} + H^2O \rightarrow \text{bilirubine} + \text{fer.}$$

En partant de l'hémochromogène R. Lemberg et R. A. Wyndham [6] ont montré que le premier temps de transformation, en présence d'acide ascorbique, consistait en une oxydation, amenant une rupture du cycle porphyrinique pour donner le verdohémochromogène. Ce dernier, traité par l'acide chlorhydrique, perd l'élément ferrugineux et se transforme en biliverdine. Enfin, par une réaction secondaire, on obtient la bilirubine.

D'une façon schématique nous pouvons résumer ce phénomène :

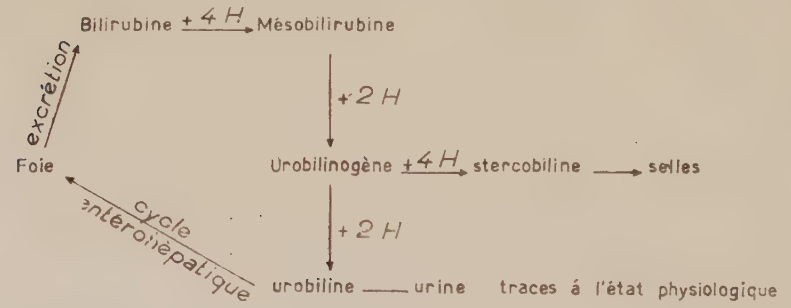
hémoglobine → globine + hématine
hématine → verdohémochromogène →
→ biliverdine → bilirubine.

La biliverdine apparaît donc comme le précurseur de la bilirubine dans l'organisme. R. Lemberg et R. Wyndham [7] ont d'ailleurs montré que les tissus étaient capables d'opérer cette transformation.

La bilirubine (C^{33} 4^{36} O^6 N^4) et la biliverdine (C^{33} H^{34} O^6 N^4), déversées par le canal cholédoque dans le duodénum, subissent à partir de l'iléon des réactions hydrogénantes, sous l'action de la flore physiologique intestinale, pour donner la mésobilirubine (C^{33} H^{40} O^6 N^4), puis l'urobilinogène (C^{33} H^{44} O^6 N^4), lequel, oxydé par l'air, produit l'urobiline (C^{33} H^{42} O^6 N^4). Enfin, par une hydrogénation ultime, on aboutit à la stercobiline (C^{33} H^{48} O^6 N^4).

Suivant la théorie classique formulée par Fischler, en 1906, du cycle entérohépatique des pigments biliaires, l'urobiline est absorbée au niveau de l'intestin et retourne au foie par la circulation porte, pour redonner vraisemblablement de la bilirubine (E. et L. Hedon [3]).

On peut schématiser ce cycle comme suit :



Cependant certains auteurs, notamment M. Brulé et M. Spilliaert [8], n'admettent pas ces conclusions. En se basant sur des faits cliniques et expérimentaux, particulièrement sur la présence de stercobiline dans les selles après l'arrêt expéri-

mental du flux biliaire, ces auteurs estiment que le passage du pigment ne s'effectue pas de l'intestin dans le sang, mais bien, au contraire, du sang dans l'intestin.

B. — Préparation de la bilirubine.

On extrait la bilirubine des calculs biliaires de bœuf par précipitation de bilirubinate de calcium suivant divers procédés brevetés, dont la plupart demeurent secrets.

Toutefois, aux Etats-Unis, D. Porsche, E. F. Pike et J. L. Gabby [9] ont fait connaître le principe d'extraction suivant : « Une solution contenant les sels biliaires et les sels de bilirubine est acidifiée puis mélangée avec un hydrocarbure aromatique chloré, liquide à l'état normal, afin d'avoir une dissolution sélective de la bilirubine libérée par l'acidification. Le bilirubinate de calcium peut être fabriqué en précipitant la bilirubine par du chlorure de calcium en milieu ammoniacal et en lavant le précipité successivement par l'eau, l'alcool et l'éther. »

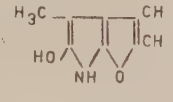
C. — Constitution.

Nous avons relevé les détails de la constitution de la biliburine dans le récent ouvrage de M. Polonovski et Lespagnol [10]. Ces auteurs ont condensé en une vue d'ensemble les résultats de multiples recherches, qui ont permis d'élucider la formule de la bilirubine et d'expliquer ainsi ses différentes propriétés physico-chimiques.

Voici le détail des réactions caractéristiques de ce pigment :

1° Oxydée énergiquement, la bilirubine ne donne, comme l'hémine, que de l'acide hématique : on ne trouve pas d'imide basique.

2° Par action d'acide nitreux sur la bilirubine, il se forme un corps pyrrolofuranique :

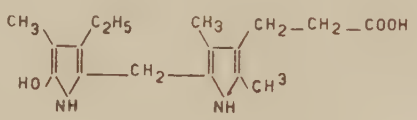


3° La bilirubine possède deux carboxyles estérifiables par le diazométhane (Kuster).

4° Par hydrogénation catalytique, elle fixe 2 H^2 en se transformant en mésobilirubine (comme l'hémine en mésohémine), qui s'oxyde en acide hématique et en méthyléthylmaléinimide.

5° Une hydrogénation catalytique plus poussée, ou la réduction par l'amalgame de sodium, fournissent le mésobilirubinogène, qui est la substance mère de l'urobiline.

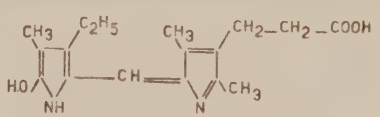
6° Une réduction encore plus forte (HI) la dégrade en acide bilirubinique (I) C^{17} H^{22} O^3 N^2, cryptopyrrolcarboxylique et en cryptopyrrol :



(I) Acide bilirubinique.

La bilirubine contient quatre groupes pyrrol et un cycle hydrofuranique, qui est rompu dans le mésobilirubinogène.

7° Lorsqu'on traite la bilirubine ou la mésobolirubine par le méthylate de potassium, on obtient un autre acide, moins hydrogéné, l'acide xanthobilirubinique (II) $C^{17}H^{20}O^3N^2$:



(II) Acide xanthobilirubinique.

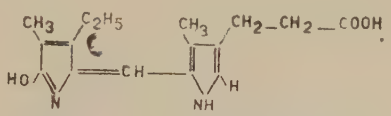
qui donne d'ailleurs, par réduction, l'acide bilirubinique (I). On a entre ces deux acides la même relation qu'entre les mésoporphyrines et les mésoporphyrinogènes, entre les dipyrrylméthènes et les dipyrrylméthanes.

Remarquons en passant l'obtention facile de ce dipyrrylméthane, et même du dipyrrylméthène (l'acide xanthobilirubinique), dans les conditions où l'hémine ou l'hématoporphyrine sont entièrement décomposées.

La bilirubine possède 33 carbones, l'acide bilirubinique 17.

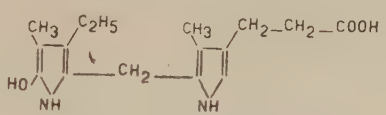
La bilirubine ne peut donc comporter deux groupements d'acide bilirubinique.

8° La mésobilirubine conduit par fusion avec le résorcinol, par ablation des chaînes vinyliques, à un acide bien cristallisé, très voisin de l'acide xanthobilirubinique, mais possédant un carbone de moins, l'acide néoxanthobilirubinique $C^{16}H^{20}O^2N^2$ (III) :



(III) Acide néoxanthobilirubinique.

9° L'acide néoxanthobilirubinique est réduit par l'amalgame de sodium en un leucodérivé cristallisé, l'acide néobilirubinique (IV) (diazoréaction d'Ehrlich positive), qui régénère l'acide initial par chauffage à 130° avec CH^3OK :



(IV) Acide néobilirubinique.

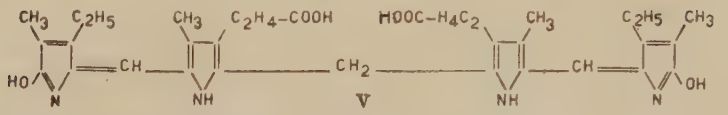
L'acide néobilirubinique représente la deuxième partie de la molécule de mésobilirubine.

On a donc avec l'acide bilirubinique $C^{17}H^{22}O^3N^2$ et l'acide néobilirubinique $C^{16}H^{20}O^3N^2$ les constituants de la bilirubine $C^{33}H^{36}O^6N^4$. Par condensation de l'acide xanthobilirubinique, H. Fischer réalisa d'ailleurs la synthèse d'une mésobilirubine.

10° Cette mésobilirubine synthétique, qu'on nomme K-mésobilirubine, est très voisine de la mésobilirubine naturelle. Cependant le point de fusion de l'acide néoxanthobilirubinique qu'elle donne par fusion résorcinique est supérieur de 13° à celui de l'acide issu de la mésobilirubine vraie.

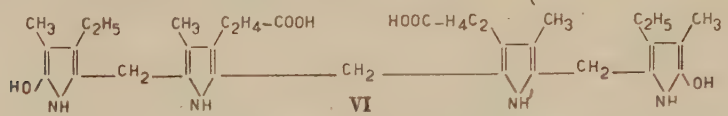
Réduite par l'amalgame de sodium elle donne, comme la mésobilirubine naturelle, un K-mésobilirubinogène, transformé également en une urobiline par oxydation (iode).

La formule de cette K-mésobilirubine (V) est :



V

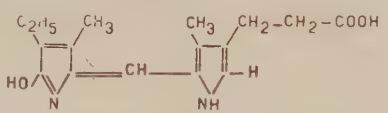
et de K-mésobilirubinogène (VI) :



VI

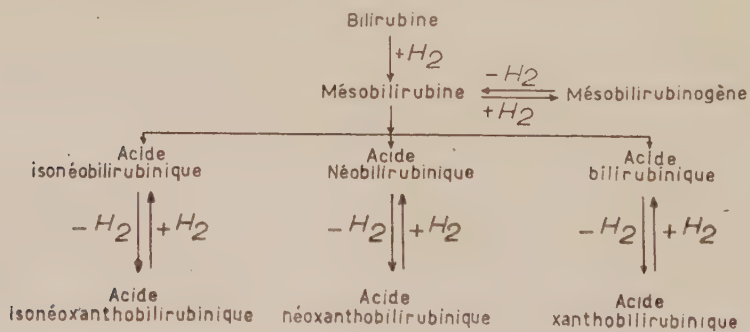
11° Mais, si l'on adoptait cette formule pour la mésobilirubine vraie, on ne pourrait s'expliquer le passage de l'hémine à la bilirubine sans invoquer une transformation peu vraisemblable du type III au type IV des étioporphyrines. L'étioporphyrine, qui correspondrait à la K-mésobilirubine par rupture de la chaîne porphyrique (départ du CH par oxydation et introduction des deux OH en αα'), devrait être, en effet, une tétraméthyl 1-3-6-8-tétraéthyl 2-4-5-7-porphine (type IV).

12° H. Fischer et Siedel ont montré dernièrement que la fusion résorcinique de la mésobilirubine ne donnait pas seulement l'acide néoxanthobilirubinique (III) (F. 287°), mais aussi un acide de point de fusion très voisin (F. 289°), l'acide isonéoxanthobilirubinique (VII) :

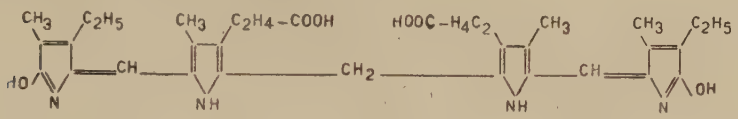


(VII) Acide isonéoxanthobilirubinique.

La synthèse a été réalisée en passant par une mésobilirubine symétrique :



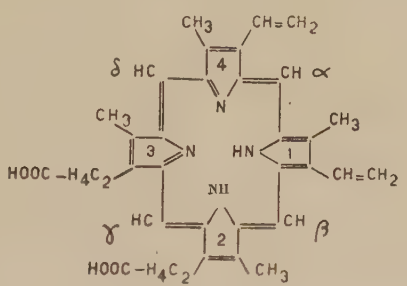
La mésobilirubine vraie, en tenant compte de la formation des acides isonéoxanthobilirubinique et xanthobilirubinique, répond donc à la formule (VIII) :



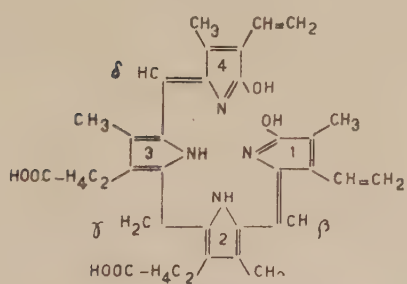
VIII

du type de l'étioporphyrine (III).

La bilirubine (IX) résulterait de l'oxydation de la protoporphyrine au niveau du CH :

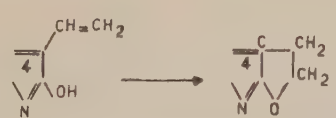


Protoporphyrine.



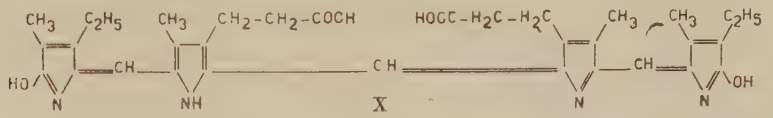
(IX) Bilirubine.

Il est probable que le groupement vinyle du noyau 4 se cyclise secondairement avec l'oxhydryle en un noyau hydrofuranique.



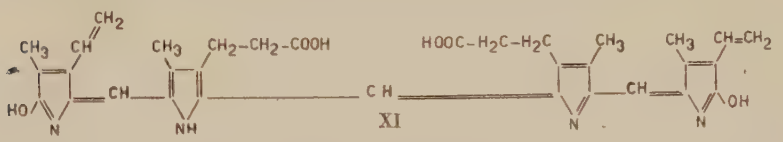
13° En oxydant la mésobilirubine par Fe^2Cl^6 en liqueur acé-

tique, on obtient une déhydromésobilirubine donnant avec le chlore ferrique un beau sel bleu foncé, que H. Fischer a nommé ferrobiline. Le départ de la copule ferrique (par action de la soude ou du carbonate neutre de sodium) conduit à la glaucobiline (X) :



X

qu'on peut rapprocher de l'utéroverdine naturelle (XI), déhydrobilirubine vert bleu des bords du placenta de chien :

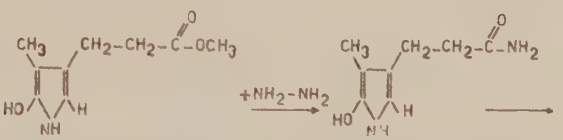


XI

La formule (IX) semble, en définitive, représenter de façon exacte la constitution physico-chimique de la bilirubine. Elle vient d'ailleurs, en 1942, d'être démontrée par H. Fischer et ses collaborateurs, qui ont réussi à faire la synthèse de ce pigment. Cette opération est extrêmement complexe, et nous ne l'exposerons ici que d'une façon schématique.

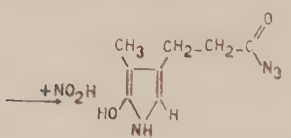
D. — Synthèse [11].

Le point de départ est l'esther méthylique de l'acide oxy-opso-pyrrolcarbonique :

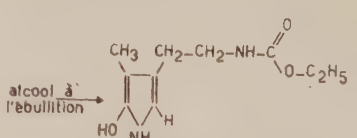


(I) Acide oxy-opso-pyrrolcarbonique (esther méthylique).

(II) Hydrazide de l'acide oxy-opso-pyrrolcarbonique.

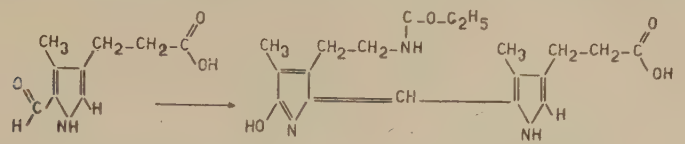


(III) Azide de l'acide oxy-opso-pyrrolcarbonique.



(IV) Uréthane de l'acide oxy-opso-pyrrolcarbonique.

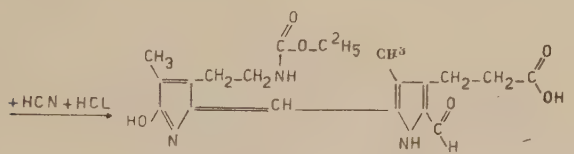
L'uréthane IV en milieu alcalin est condensé avec l'aldéhyde de l'acide opsocarbonique, et donne le pyrrométhène :



Aldéhyde de l'acide opso-carbonique.

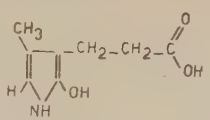
(V) Pyrrométhène.

Ce dernier + HCN et HCL additionne le groupe formyl et donne le formylpyrrométhène :



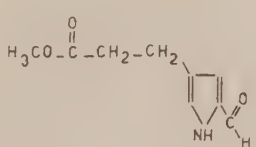
(VI) Formylpyrrométhène.

D'autre part, on fait une synthèse analogue en partant de l'acide iso-oxy-opso-pyrrolcarbonique :

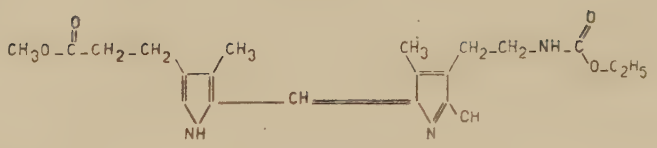


Acide iso-oxy-opso-pyrrolcarbonique.

qu'on transforme successivement en ester méthylique, en hydrazide, en azide et en iso-uréthane, par des réactions semblables à celles utilisées ci-dessus pour obtenir les composés I, II, III, IV. Cet iso-uréthane condensé en milieu alcalin avec l'aldéhyde de l'acide opso-carbonique donne l'iso-uréthane-oxy-méthylène :

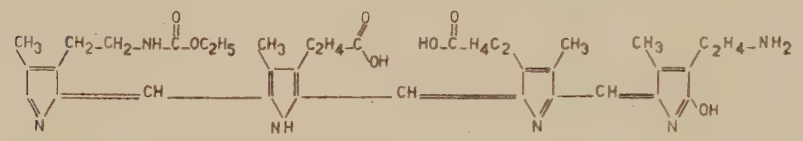


Aldéhyde de l'acide opso-carbonique.



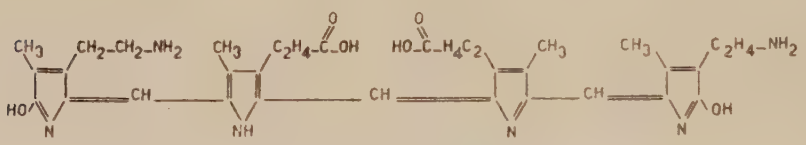
(VII) Iso-uréthane-oxy-méthylène.

On effectue ensuite une condensation acéto-formique des composés VI et VII, et l'on obtient l'uréthane-glaucobiline :



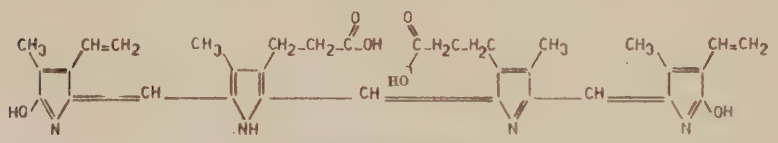
(VIII) Uréthane-glaucobiline.

Cette dernière, traitée par l'acide chlorhydrique, donne la diamine-glaucobiline :



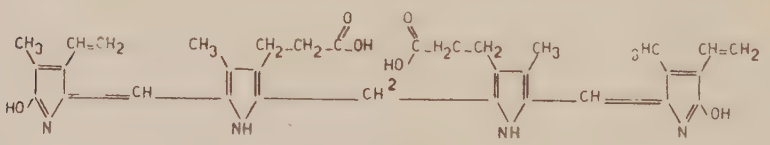
(IX) Diamine-glaucobiline.

laquelle, par méthylation épuisante en passant par un complexe avec le zinc, fournit la biliverdine :



(X) Biliverdine.

Enfin, la biliverdine, réduite par le zinc en présence d'acide acétique, donne la bilirubine :



(XI) Bilirubine.

E. — Propriétés physiques.

I. — Cristallisation.

La bilirubine présente deux formes de cristallisation possible. La première en tablettes monocliniques à partir de ses solutions dans le chloroforme, dans le tétrachlorure de carbone ou dans le toluène monochloré. La seconde en prismes obliques à partir de ses solutions dans la diméthylaniline [12].

II. — Solubilité.

La bilirubine est très peu soluble dans l'eau et peu soluble dans les solvants neutres, mais sa solubilité est en général mal définie. Nous n'entrerons pas ici dans les discussions qui ont trait à la nature de la bilirubine sanguine. Nous avons vu plus haut que de nombreux auteurs admettent, en effet, l'existence dans le sang de deux pigments d'origine différente : l'un, insoluble dans le tétrachlorure de carbone, donnant l'azo-réaction « directe », l'autre, soluble dans le tétrachlorure de carbone, donnant l'azo-réaction « indirecte ». Mais les travaux récents de Charonnat et de Varela [13] ont montré que l'on arrive à solubiliser toute la bilirubine du sang dans le chloroforme, l'éther ou l'alcool en présence de sulfate de magnésie ou de sulfate de sodium et à obtenir par suite la réaction « directe » vis-à-vis de la totalité du pigment.

III. — Analyse spectrale.

Nous avons cherché à faire une étude spectrophotométrique comparative de la bilirubine et de ses divers produits d'oxydation obtenus avec le sulfate de cuivre, que nous avons choisi comme réactif dans nos recherches personnelles [1].

(1) Cf. chapitre II.

Voici quelques-uns des spectres que nous avons étudiés :

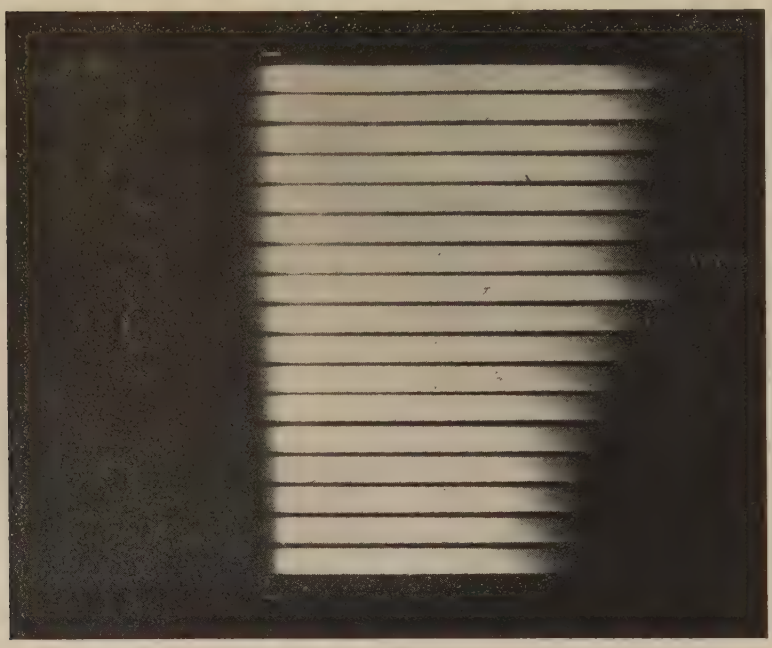


Fig. 1.

Ces spectres sont ceux d'une solution de bilirubine pure dans l'alcool ammoniacal. La concentration est de 1 mg. pour 100 cm³ de solution, puis de 10 mg. p. 100.

Spectres	Concentration en mg. p. 100	Épaisseur de la solution en millimètres	Spectres	Concentration en mg. p. 100	Épaisseur de la solution en millimètres
1	1	4	7	10	1
2	1	5	8	10	2
3	1	6	9	10	3
4	1	7	10	10	4
5	1	8	11	10	5
6	1	9	12	10	6
			13	10	7
			14	10	8
			15	10	9
			16	10	10

Nous voyons une très faible absorption dans le violet et une bande un peu plus nette dans le rouge.

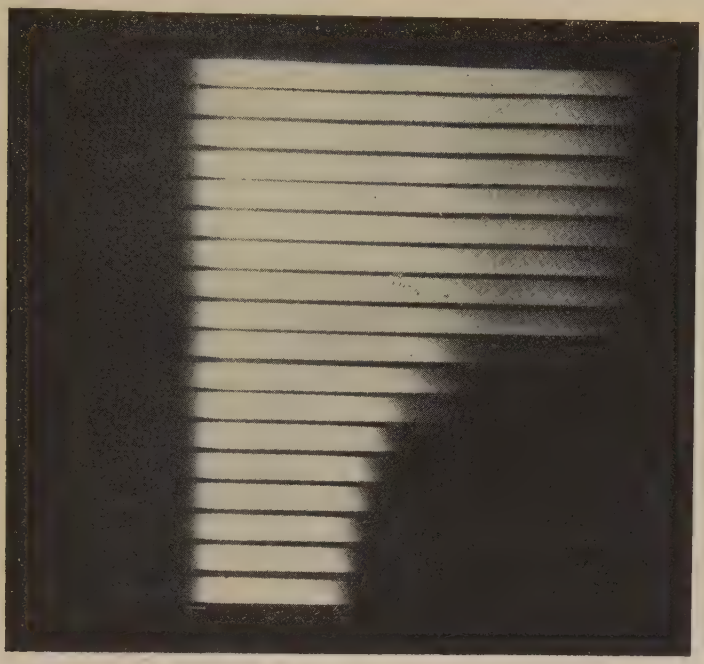


Fig. 2.

Voici le détail de ces spectres, obtenus à partir d'une solution de bilirubine quinze minutes après le début de l'oxydation par le sulfate de cuivre en milieu chlorhydrique :

Spectres	Concentration en mg. p. 100	Épaisseur de la solution en millimètres	Spectres	Concentration en mg. p. 100	Épaisseur de la solution en millimètres
1	0,5	2	9	5	1
2	0,5	3	10	5	2
3	0,5	4	11	5	3
4	0,5	5	12	5	4
5	0,5	6	13	5	5
6	0,5	7	14	5	6
7	0,5	8	15	5	7
8	0,5	9	16	5	8
			17	5	9
			18	5	10

Si nous comparons ces spectres à ceux déjà obtenus avec la bilirubine non oxydée, nous constatons que c'est surtout l'absorption dans le rouge qui a augmenté avec l'oxydation, tandis que les modifications d'absorption au niveau du bleu et du violet demeurent discrètes.

Enfin, nous présentons ci-dessous (fig. 3) une série de spectres obtenus à partir d'une solution de bilirubine extraite d'une selle de nourrisson de cinq jours et oxydée également par le sulfate de cuivre en milieu chlorhydrique :

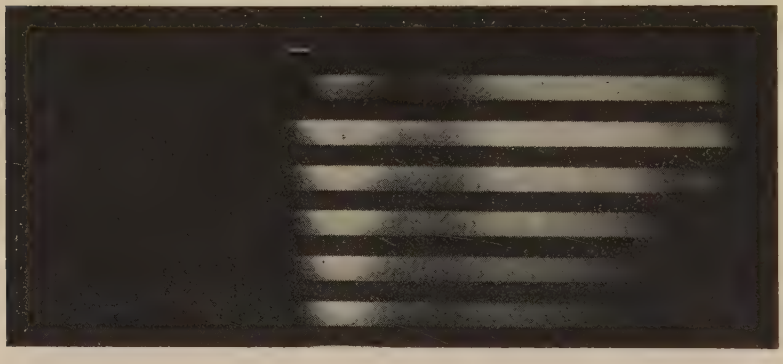


Fig. 3.

Spectres n°	Épaisseur du liquide extractif en millimètres	Spectres n°	Épaisseur du liquide extractif en millimètres
1	Spectre normal	4	6
2	2	5	8
3	4	6	10

Ces spectres permettent de déceler le pigment contenu dans notre liquide extractif par la mise en évidence de la bande d'absorption, caractéristique, située dans le rouge.

IV. — Fluorescence [14].

La bilirubine à l'état solide possède une nette fluorescence rouge. Mais en solution la fluorescence fait en général défaut, sauf dans les solutions chloroformiques, qui en présentent une

légère dans le vert jaunâtre. Par contre, les solutions des produits d'oxydation suffisamment avancée de ce pigment, telles que celles de biliverdine et de bilicyanine, offrent des fluorescences connues depuis longtemps.

1° *Bilicyanine*. — Stokvis signale que les solutions neutres mais surtout ammoniacales ont une fluorescence rouge. Dhéré a montré que les solutions acides, même fortement acides, ont également une fluorescence, mais que celle-ci est surtout décelable dans l'ultra-violet.

Auché [107], qui a étudié de près la fluorescence zincique des dérivés d'oxydation de la bilirubine, a mis en évidence une belle fluorescence rouge grenat, visible en plein jour. Dhéré, cherchant à déterminer l'axe de la bande de fluorescence, trouve comme longueur d'onde 653 mμ. Il note avec Barrenscheen et Weltmann une seconde bande dans la région jaune. Enfin, en relation avec l'excitation de la fluorescence, il trouve une troisième bande pouvant s'étendre jusqu'à 360 mμ.

2° *Biliverdines naturelles* (utéro-verdine). — R. Lemberg [15] a indiqué une belle fluorescence rouge en ultra-violet quand on traite les biliverdines par les sels de zinc. B. Gouzon [16] a déterminé l'axe de cette bande de fluorescence à 662 mμ.

3° *Produit d'addition de la bilirubine avec l'acide chlorhydrique*. — L'acide chlorhydrique donne avec les solutions de bilirubine un composé rouge qui possède en solution chloroformique une belle fluorescence verte, comme le signale W. Küster, d'après les résultats obtenus par R. Schmiedel.

V. — Dilution des solutions.

Dans une étude sur les variations de densité optique des solutions de bilirubine en fonction de la concentration, M.-A. Boutaric et M. Roy [17] ont signalé que la loi de Beer et Lambert [18] est vérifiée pour les solutions contenant du

sérum de cheval tamponné avec un milieu de pH voisin (milieu de Sorensen PO^4H^2K et PO^4Na^2H pH = 7,4), mais ne l'est pas avec des solvants non albumineux et non tamponnés.

F. — Propriétés chimiques [1].

I. — Azoréactions.

La bilirubine donne avec les azoréactifs des produits de copulation ayant une coloration rouge violacé intense. Différents azoréactifs ont été proposés :

Avec l'acide sulfanilique et le nitrite de sodium, on obtient une coloration signalée successivement par : Ehrlich [19], Riegler [20], Krokiewicz et Batko [21], Proscher [22], Orndorf et Teeple [23], H. van den Berg [24], Zins [25], Hoesch [26], G. Hunter [27]), K. Jegorov [28], Godfried [29], C. E. May, R. Maltindale et W. F. Boyd [30]. Ces derniers auteurs ont noté qu'en solution neutre on obtient une vive coloration avec le chlorure de p-sulfodiazobenzène; en solution acétique, par contre, c'est avec le chlorure de p-nitrodiazobenzène qu'il faut opérer; enfin, la réaction est positive avec ces deux réactifs en milieu alcalin.

Signalons également deux modifications de la réaction à l'acide sulfanilique. La première, de Laemmer et Beck, qui ajoutent à la réaction d'Erlich l'action de l'acide chlorhydrique, qui fait virer la coloration rose au violet. La seconde, de T. K. With [31], qui remplace l'acide chlorhydrique par l'acide nitrique : la coloration terminale est bleue.

Nous pouvons enfin rapprocher de ces réactions celle de Herzfelb [32], qui consiste à faire agir sur la bilirubine le diméthylaminobenzaldéhyde au bain-marie. Mais il ne s'agit pas là d'une azoréaction proprement dite [33].

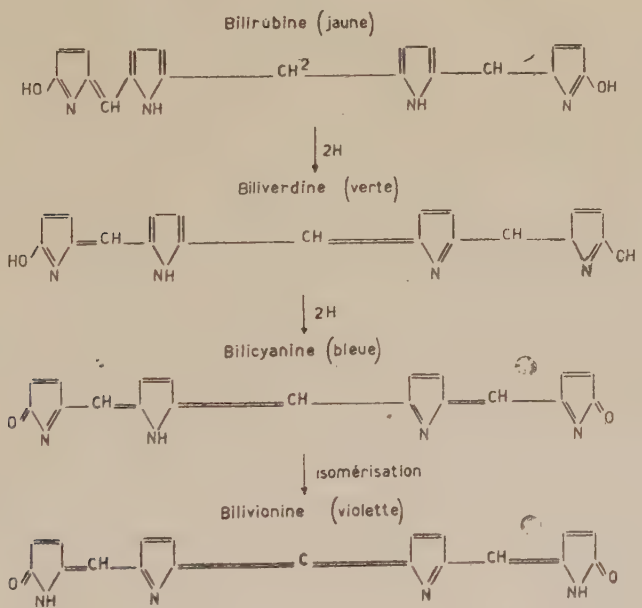
---

(1) Dans sa thèse de pharmacie, passée à Paris en 1938, M. Lachaux a fourni sur ce sujet une importante bibliographie, dont nous nous sommes en partie inspiré.

Dans ces azoréactions, nous notons la présence de nitrite de sodium, qui est un oxydant, et qui exerce certainement une action sur la bilirubine. Aussi peut-on admettre qu'à la fin de la réaction on a un mélange d'azobilirubine et de divers produits d'oxydation de ce corps. La coloration finale serait donc une superposition de couleurs correspondant à différents dérivés.

II. — Réactions d'oxydation.

H. Fischer et H. W. Haberland [34] ont particulièrement bien étudié ce phénomène. Voici le schéma de l'oxydation de la bilirubine qu'ils proposent :



Parmi les principaux réactifs d'oxydation, citons :

1° *Acide nitrique nitreux à 10 p. 100* : Pour la première fois, nous trouvons en 1826 ce réactif d'oxydation signalé par Gmelin [33]. Si l'on ajoute à une solution de bilirubine

de l'acide nitreux, on obtient une oxydation de la bilirubine, qui, primitivement jaune, devient bleue, puis violette, rouge, et même jaune. C'est un réactif brutal. Cette réaction a encore été signalée par Rosenbach [36], Dragendorff [37], Presslich [38] et H. N. Naumann [39].

2° *Acide nitrique associé à l'acide sulfurique :* Réaction mentionnée par Brucke [40] en 1859.

3° *Nitrate de sodium associé ou non à* SO^4H^2 *:* Il donne une oxydation qui atteint d'emblée le stade bilicyanine bleue, puis la réaction se continue doucement. Elle a été citée par : Fleichl [41], Vitali [42], Ultzmann [43], Masset [44], Klehbiel [45], Gilbert, Herscher et Posternack [46], Steensma [47], von Spalitta [48], J. Glass [49], Dhéré [50], G. Denigès, L. Chelle et A. Labat [51], et Halberkann et Reiche [52].

4° *Acide chromique ou bichromate de potassium :* Cités par Rosenbach [53] et Biffi [54].

5° *Iode seul ou associé :* C'est un oxydant de la bilirubine très usité, que nous trouvons signalé par : Trousseau et Dumontpallier [55], Maréchal [56], W. G. Smith [57], Kathrein [58], H. Rosin [59], Le Nobel [60], Obermayer et Popper [61], Jolles [62], Ch. Déré [14] et Auché [63].

6° *Brome*, proposé par Capranica [64]. Pour Maly [65], il ne s'agirait pas d'une oxydation, mais d'un composé d'addition bleu, la tribromobilirubine.

7° Le *persulfate d'ammonium* est un oxydant lent au début, puis brutal à la fin. Il a été choisi par Hugounenq [66] et par C. R. Schmidt, K. K. Jones et Ivy [67].

8° *Chlorate de potassium :* Cité par Klehbiel [45].

9° *Perchlorure de fer* seul ou associé à un acide tel que l'acide chlorhydrique, l'acide acétique ou l'acide trichloracétique. A été préconisé par Cuerra [68], Piettre [69], Fouchet [70] et Grigaut [71].

10° *Solution saturée à froid de sublimé :* Elle donne avec la

bilirubine un composé d'oxydation vert. Cette réaction a été proposée pour la première fois par Schmidt, puis par Goiffon, qui en a fait une réaction classique de la recherche de ce pigment dans les selles.

11° *Sublimé acétique :* Triboulet [72] a utilisé ce réactif, qui donne à peu près la même oxydation que la solution saturée à froid de sublimé, mais un peu plus faible cependant.

12° *Bleu de méthylène* : Il a été employé par J. Seide et K. Zink [73] pour caractériser la bilirubine dans les urines après oxydation en biliverdine; mais P. Balatre [74] fait remarquer qu'il n'y a aucune oxydation et que le vert obtenu n'est que la superposition de la couleur bleue du réactif et de la couleur jaune de l'urine. Pour ce motif, nous avons tenu à éprouver ce réactif avec une solution de bilirubine pure, mais nous n'avons obtenu aucun résultat net, bien que M. Strani [75] considère ce réactif comme très satisfaisant.

13° *Sulfate de cuivre :* Ch. Kühn [76] propose comme oxydant une solution de sulfate de cuivre ammoniacale. Nous avons particulièrement étudié l'action de ce réactif, qui est un catalyseur d'oxydation, surtout en présence d'alcool. En milieu sodique ou ammoniacal, il engendre de la biliverdine, qui, en présence de traces d'acide nitrique, s'oxyde brutalement en un pigment violet. En milieu neutre, la réaction est beaucoup plus faible et moins sensible. Nous avons vérifié également que d'autres sels de cuivre, comme le chlorure ou l'acétate, avaient la même action que le sulfate, et nous en avons conclu que c'était bien l'ion cuivre qui était le catalyseur de l'oxydation.

14° *Eau oxygénée* : Elle a été employée, associée à l'acide chlorhydrique et à l'alcool, par : Adler et E. Meyer [77], Maslow [78], H. Sternberg [79] et H. T. Malloy et K. A. Evelyn [80].

15° *Acide trichloracétique* ou *acide acétique chloré :* Ils ont été recommandés par Piettre [71], Maly [82], D. Adlesberg et O. Porges [83] et Fouchet [70].

16° *Mélange d'acides chlorhydrique, nitrique et alcool :* Ce réactif a été utilisé par Hammarsten [84].

17° *Bioxyde de plomb :* Pour l'étude de la mésobilirubine, H. Fischer et H. W. Haberland [85] signalent l'action lente de ce réactif, qui peut être retenu aussi pour la bilirubine.

III. — Réactions d'hydrogénation.

1° *Amalgame de sodium :* Avec l'amalgame de sodium, on obtient un leuco-dérivé, le mésobilirubinogène, identique à l'urobiline, signalé par Fischer et Meyer-Betz [86].

2° *Hydrogénation catalytique :* Elle permet de laisser intact le système bilidiène et d'attaquer les chaînes latérales. On obtient, suivant Fischer et Haberland [87], une hydrobilirubine, puis un dérivé tétrahydrogéné [88].

IV. — Auto-oxydation de la bilirubine.

La manipulation de la bilirubine est rendue très délicate par son oxydation rapide, mais surtout par un phénomène particulier, connu sous le nom d'auto-oxydation. Nous avons nous-même constaté que la conservation d'une solution de bilirubine pure est de très courte durée. Rapidement, les diazoréactifs et aussi les réactifs d'oxydation manifestent une diminution considérable d'activité sur le pigment. La cause en est une auto-oxydation rapide de la bilirubine. Tous les auteurs signalent, en effet, que le dosage de la bilirubine dans un liquide biologique doit être fait le plus tôt possible. Ce phénomène n'est pas encore bien expliqué, mais l'on peut supposer que l'on se trouve en présence d'une transposition moléculaire qui vient bloquer des hydrogènes actifs (1).

Pour éviter ces auto-oxydations, quelques auteurs ont essayé divers procédés :

1° M.-A. Boutaric et M. Roy [17] proposent, pour conser-

(1) Charonnat, communication verbale.

ver les solutions de bilirubine pure, de faire une solution dans l'eau bouillie gardée à 0° à l'abri de la lumière, après avoir recouvert la surface d'une mince couche d'huile de vaseline pour empêcher le contact avec l'air.

2° Ces auteurs préconisent également le procédé suivant : stabilisation de la solution par adjonction de sérum de cheval ou de sérum-albumine et addition, pour maintenir le pH, de mélanges tampons, constitués par des sels anions polyvalents.

3° Barac [89] conseille d'ajouter de l'acide ascorbique, en milieu alcalin, pour conserver les solutions de bilirubine.

4° Enfin, E. A. Peterman [90] stabilise la bilirubine dans la bile en la précipitant sous forme de bilirubinate de calcium. Pour la doser, il suffit de la libérer de son sel en acidifiant par l'acide chlorhydrique.

V. — Etude du vieillissement d'une solution de bilirubine.

1° Pour une solution en alcool éthylique à 95°, il y a autooxydation en vingt-quatre heures (azoréaction négative).

2° Pour une solution en alcool éthylique à 95° sodé, il apparaît au bout de vingt-quatre heures une coloration verte, due à une oxydation spontanée et partielle de ce pigment. L'autooxydation est considérable, puisque l'azoréaction est négative.

3° Pour une solution en alcool éthylique à 95° acétique, il ne se produit pas de modification de coloration, mais l'autooxydation est complète après vingt-quatre heures (azoréaction négative).

4° Pour une solution en alcool éthylique à 95° ammoniacal, la conservation est meilleure, mais on constate au bout d'un mois qu'environ un tiers de la bilirubine a disparu au réactif, malgré son maintien à + 4° et à l'obscurité. D'après nos recherches, c'est ce dernier solvant qui assure la meilleure conservation du pigment.

CHAPITRE II

RECHERCHE QUALITATIVE DES PIGMENTS BILIAIRES DANS LES SELLES [1]

Dès le siècle dernier, l'intérêt clinique qui s'attache à la recherche des pigments biliaires dans les selles a été bien vu. De nombreux auteurs ont mis au point diverses réactions chimiques capables d'assurer leur caractérisation. Ces réactions ont été rapportées précédemment dans l'étude chimique de la bilirubine. Nous n'envisagerons ici que les techniques classiques d'utilisation courante à l'heure actuelle, et nous soulignerons pour chacune d'elles les inconvénients et les imperfections qu'elles présentent.

A. — Méthodes successivement proposées.

I. — Réaction de la fluorescence aux sels de zinc. Technique de Morel et Policard [91].

Elle est basée sur la recherche de la fluorescence de la stercobiline en contact avec les sels de zinc.

Réactifs :

1° Alcool éthylique à 95°;
2° Acétate de zinc en cristaux;
3° Chloroforme.

Technique. — « Délayer une petite quantité de matière fécale dans quelques centimètres cubes d'eau. Décanter. Ajouter à

(1) Que les infirmières de l'Hôpital Boursier veuillent bien trouver ici tous nos remerciements.

la solution obtenue son volume d'alcool. Ajouter une pincée d'acétate de zinc. Agiter, filtrer et repasser sur le filtre jusqu'à liquide clair. Verser dans ce liquide 1/10 de son volume de chloroforme et agiter vivement. Laisser déposer jusqu'à ce que le liquide soit complètement clair.

» L'urobiline communique au chloroforme une fluorescence visible lorsque l'on dirige sur le tube un étroit faisceau lumineux. L'urobiline peut encore être dépistée par l'examen spectroscopique du chloroforme. »

Critique. — Cette réaction est très ancienne, et nous la trouvons signalée par M. Jaffé [92] en 1869. Elle est employée couramment avec d'excellents résultats pour la recherche de l'urobiline dans les urines, mais, dans son utilisation en coprologie, elle présente l'inconvénient important de n'être valable que pour la seule stercobiline, et non pour la bilirubine. C'est pour ce motif que nous lui préférons les réactions suivantes, valables pour les deux pigments à la fois. Notons de plus que, comme l'ont fait remarquer de nombreux auteurs, en particulier R. Goiffon [93] et N, Fiessinger [94], cette réaction est très sensible, et même trop sensible, puisqu'il est rare qu'elle donne un résultat absolument négatif, même lorsqu'il existe cliniquement une oblitération des voies biliaires (stercobiline d'origine sanguine).

II. — Réaction au sublimé. Technique de R. Goiffon [93].

L'utilisation de ce réactif a été pour la première fois proposée par Schmidt, de Halle, mais c'est la technique de Goiffon qui est désormais classique.

Réactif. — Solution aqueuse saturée de sublimé.

Technique. — « Dans un tube à essais contenant une dilution fécale (5 p. 100), on verse quelques centimètres cubes du réactif. Au bout d'un certain temps (qui peut aller de cinq minutes à vingt-quatre heures et en moyenne une demi-heure), la réaction apparaît; le liquide, et surtout le dépôt,

se colorent en rouge brique s'ils contiennent de la stercobiline ou du stercobilinogène, en vert s'ils contiennent de la bilirubine non transformée. Enfin, aucune réaction ne se produit si les pigments sont absents.

» La réaction est d'autant plus rapide que les selles sont plus fraîches et contiennent plus de stercobiline; le maintien du tube à 37° l'accélère notablement. »

Critique. — Le temps de lecture de la réaction est peu précis et peut être long : de cinq minutes à vingt-quatre heures. De plus, la coloration obtenue est toujours superposée à celle d'une dilution fécale trouble, qui ne se prête pas à une lecture facile. Nous avons, en effet, constaté bien souvent que, dans les réactions faiblement positives, où la coloration rose est en grande partie absorbée par le milieu fécal, l'interprétation du résultat manquait de netteté. Par ailleurs, cette technique nous a toujours donné de meilleurs résultats avec les selles d'adultes à stercobiline qu'avec les selles à bilirubine. Dans ce cas, en effet, elle nous a paru moins sensible.

III. — Réaction au sublimé acétique. Technique de Triboulet [72].

Cette réaction est certainement la plus utilisée en clinique courante pour la recherche des pigments biliaires dans les selles de nourrissons. Son réactif, bien que très voisin de celui de Schmidt, a été découvert par Triboulet sous la forme suivante :

Réactif :

Eau distillée, 100 cm³;
Sublimé, 3 g. 50;
Acide acétique, 1 cm³.

Technique. — « Placer dans un tube à essais un peu de matière fécale fraîchement émise (1 cm³, environ 1/2 noisette). Délayer dans 10 à 15 cm³ d'eau distillée froide ou tiède; agiter pour mélanger — voilà le premier temps du procédé d'exa-

men. Ajouter alors VIII à X gouttes de la solution de sublimé acétique — tel est le second et dernier temps de cette réaction simple et pratique.

» Le tube est alors placé bien droit dans un porte-tubes, et, dans un temps variable, une demi-heure à deux heures suivant les cas, le résultat est obtenu, mais mieux après vingt-quatre heures. Comme le tube garde le même aspect pendant plusieurs jours, on a la possibilité de faire un examen systématique. »

Résultats : 1° Vert vif : beaucoup de bilirubine : hypercholie, catarrhe intestinal ou altération de la muqueuse.

2° Vert-de-gris faible, jaunâtre ou grisâtre : pas assez de bile ou de mauvaise qualité.

3° Dépôt blanc comme lait : pas de bile; ictère par rétention par exemple.

Critique. — N. Fiessinger, H. R. Olivier et M. Herbain [94] signalent des causes d'erreur nombreuses. En effet des aliments, des jus de fruits, des bonbons, le carmin et le charbon peuvent colorer les matières et donner par le sublimé acétique des réactions que l'interrogatoire permet d'attribuer à leur véritable cause. Mais il est bien difficile dans la pratique, pour le laboratoire, de se renseigner d'une façon précise sur ce point. C'est pourquoi nous avons tenu à obvier à cet inconvénient, dans notre technique personnelle, par l'obtention d'une solution extractive témoin, qui nous signale la présence de pigments étrangers.

La réaction de Triboulet nous a paru supérieure à celle au sublimé pour les selles à bilirubine, mais elle est moins sensible pour les selles à stercobiline.

Cette technique, comme la précédente, peut être longue, et la lecture est toujours faite sur un milieu trouble, peu favorable à une appréciation colorimétrique.

IV. — Réaction au perchlorure de fer. Technique de Grigaut [71].

Elle utilise l'oxydation directe des pigments, qui prennent une coloration caractéristique.

Réactif. — Solution de perchlorure de fer à 1 p. 20.

Technique. — « Dans un tube à essais les fèces sont délayées dans l'eau bouillante, puis additionnées d'un volume égal d'acide chlorhydrique pur et de quelques gouttes de perchlorure de fer, qu'on laisse tomber à la surface du liquide sans agiter. Il se forme ainsi deux couches, permettant d'apprécier dans le même tube la stercobiline et la bilirubine; une coloration verte de la couche supérieure indique la présence de bilirubine; une coloration rose de la couche inférieure indique la présence d'urobiline. »

Critique. — Nous avons pratiqué cette technique en suivant point par point les indications de l'auteur. Grigaut parle de deux zones dans le liquide permettant d'apprécier dans la couche supérieure la coloration verte de la bilirubine, et dans la couche inférieure la coloration rose de la stercobiline. Or, il ne nous a jamais été possible de les obtenir dans la pratique. Nous avons constaté d'autre part que Goiffon, dans son *Précis de coprologie clinique*, ne signale pas la production de ces deux couches; il indique que la coloration est rose ou verte selon le pigment, mais l'interprétation du résultat, en cas de présence simultanée des deux corps, demeure problématique. Dans la suite de sa publication originale, Grigaut a rapporté des observations formulées par L.-C. Maillard [95]. « Ce dernier fait observer que les matières fécales peuvent renfermer, et parfois en quantité appréciable, les acides indolacétique et indolcarbonique, résultant de la désagrégation du tryptophane; or, ces chromogènes donnent, lorsqu'on additionne d'acide chlorhydrique leur solution aqueuse, des substances roses, qu'il importe de ne pas confondre avec la stercobiline. On pourrait les en distinguer en extrayant la sterco-

biline par le chloroforme et en recherchant sa fluorescence zincique. »

Nous avons, pour notre part, constaté par l'expérience et noté, après L. Heilmeyer [96] et L.-C. Maillard [95], que la bilirubine donne avec l'acide chlorhydrique à chaud une coloration rouge, de même, d'ailleurs, que la stercobiline. Ayant recherché, d'autre part, l'action de l'acide chlorhydrique seul, à chaud, sur des dilutions fécales, nous avons toujours obtenu une coloration rose, tendant vers le rouge, même en l'absence de pigments. Nous croyons pouvoir attribuer cette coloration à l'oxydation de composés phénoliques contenus dans les selles. Ce fait nous apparaît comme un inconvénient majeur, qui rend délicate l'interprétation des résultats. Il nous semble enfin opportun de signaler que l'addition d'un réactif fortement coloré, comme le perchlorure de fer, même en solution diluée, au mélange fécal ne facilite pas la mise en évidence d'une coloration rose.

V. — Réaction a l'acide trichloracétique. Méthode de D. Adlesberg et O. Porges [83].

Ces auteurs nous proposent l'emploi de l'acide trichloracétique pour la recherche des pigments biliaires dans les selles; réactif déjà conseillé par Fouchet [70], Grimbert [97], Vogl et Zins [98] dans les bilirubinémies pathologiques.

Réactif. — Acide trichloracétique à 20 p. 100.

Technique. — Trois modes opératoires différents sont indiqués par ces auteurs :

1° « On broie gros comme un pois de matière fécale avec une quantité suffisante d'acide trichloracétique à 20 p. 100. On laisse reposer le mélange quelques heures, après quoi les particules contenant de la stercobiline apparaissent rougeâtres, celles contenant de la bilirubine, vertes. »

2° « On opère comme en 1° et on filtre aussitôt le mélange. Le filtre et le résidu sont séchés à chaud avec précaution (sur

une petite flamme), après quoi les particules de matière fécale apparaissent respectivement rouges ou vertes. Le papier filtre se colore lui-même fréquemment en rouge ou en vert, suivant que les matières fécales contiennent de la stercobiline ou de la bilirubine. »

3° « On peut faire une bouillie légère avec gros comme un grain de chènevis de matières fécales et quelques gouttes d'acide trichloracétique à 20 p. 100 sur une lame porte-objet et porter le liquide à ébullition sur une petite flamme avec précaution. Après dessiccation, on peut facilement observer la préparation au microscope. »

Critique. — On peut formuler vis-à-vis des deux premiers modes opératoires de cette technique la même observation que précédemment, c'est-à-dire la difficulté de lecture en milieu trouble. Quant à la microréaction proposée en troisième lieu, nous faisons à son sujet les restrictions suivantes :

Lorsque la teneur du frottis en pigments est faible, il faut explorer le résidu très minutieusement pour avoir quelque chance de trouver les taches colorées. Lorsque ces taches sont rares et discrètes, un doute peut subsister sur leur nature véritable. La présence des résidus fécaux fortement teintés en brun foncé ne facilite d'ailleurs aucunement cette recherche. La dessiccation du frottis et l'odeur nauséabonde qu'elle entraîne constituent, d'autre part, un inconvénient. Nous avons enfin noté que la lumière artificielle n'est pas favorable à la lecture de cette microréaction, qui ne peut être pratiquée qu'en lumière naturelle.

B. — **Méthode personnelle.**

La difficulté d'interprétation ou la lenteur des réactions classiques que nous venons de passer brièvement en revue nous ont incité à chercher une technique nouvelle qui nous permette d'effectuer une réaction colorée rapide dans un milieu clarifié et dont la coloration serait susceptible d'être comparée à celle d'un liquide extractif témoin. Ce dernier

point nous a paru présenter un gros intérêt, surtout avec les selles d'adultes, dont la richesse en matière colorante d'origine alimentaire peut être très grande.

En 1936, les travaux de G. Bertrand et L. de Saint-Rat [99] ont montré que l'urobiline pouvait être utilisée pour la recherche et le dosage des sels de cuivre. On obtient une coloration rose, très sensible et très spécifique. Ces auteurs ont mentionné qu'inversement les sels de cuivre pouvaient servir comme réactifs de l'urobiline. Vis-à-vis de la bilirubine, nous avons vérifié par l'expérience, sur une solution pure, que le sulfate de cuivre constitue bien un réactif, ainsi que, d'ailleurs, Ch. Kuhn [76] l'avait mentionné en 1928, à propos de la recherche de la bilirubine dans les urines. Il n'y avait donc, dans ces conditions, à priori, aucune impossibilité d'utilisation du sulfate de cuivre pour la recherche de la stercobiline et de la bilirubine dans les selles.

Voici l'exposé du principe de la méthode et des résultats que nous avons obtenus.

Principe — Les pigments biliaires sont extraits par l'alcool éthylique à 95°, à chaud, après homogénéisation et déshydratation des selles par le sulfate de soude anhydre en milieu acétique. Le liquide extractif est filtré; sur une partie du filtrat, on effectue avec une solution de sulfate de cuivre la réaction colorée; la lecture est ensuite faite en comparaison avec la coloration de l'autre portion du filtrat.

Réactifs :

1° Acide acétique cristallisable;
2° Sulfate de soude anhydre;
3° Alcool éthylique à 95°;
4° Solution aqueuse de sulfate de cuivre à 2 p. 1.000.

Technique — « Mettre dans un mortier gros comme une noisette de selle. Ajouter VIII gouttes d'acide acétique cristallisable. Triturer avec une quantité suffisante de sulfate de soude anhydre pour obtenir une poudre sèche. Introduire cette

poudre dans un gros tube à essais; verser 10 à 15 cm³ d'alcool éthylique à 95°. Agiter une minute. Porter ensuite à l'ébullition en agitant constamment. Filtrer sur papier. Répartir le filtrat par moitié dans deux tubes. La réaction est effectuée dans l'un, l'autre sert de témoin. Ajouter alors dans le premier tube IV à V gouttes de solution aqueuse de sulfate de cuivre à 2 p. 1.000. Agiter et porter à l'ébullition pendant une minute. »

Interprétation des résultats. — En présence de stercobiline, il se développe immédiatement une coloration rose. Avec la bilirubine, on obtient une coloration vert bleu. Lorsque ces pigments se trouvent en faible quantité, la comparaison de la réaction colorée obtenue avec la coloration du tube témoin permet cependant de les déceler. Si aucune coloration ne se manifestait, on serait autorisé à conclure à l'absence de pigments.

L'interprétation des résultats est, dans certains cas, rendue délicate par l'existence simultanée des deux pigments dans les selles. On se trouve alors en présence d'une superposition de couleurs. Pour faciliter la lecture, nous avons cherché à éliminer partiellement la stercobiline. Pour cela il suffit d'alcaliniser par la soude le mélange fécal avant la filtration. L'opération est ensuite conduite comme précédemment. En milieu alcalin, la solubilité de la stercobiline est plus faible que celle de la bilirubine, et l'on arrive ainsi à démasquer la coloration vert bleu de cette dernière.

Critique. — Nous avons pratiqué cette réaction dans de nombreuses selles. Voici les divers arguments qui militent en sa faveur. L'homogénéisation et l'extraction rapide, la facilité d'obtention du réactif, sa sensibilité et sa stabilité, et la lecture en milieu limpide comparativement à celle d'un tube témoi, paraissent conférer à cette technique de nombreux avantages.

Le sulfate de soude anhydre permet d'obtenir, d'une part, une homogénéisation parfaite de la selle, d'autre part, sa

déshydratation, qui assure une meilleure extraction de tous les pigments [13]. La présence d'acide acétique cristallisable favorise encore cette extraction, surtout celle de la stercobiline.

Après des essais avec le chloroforme, l'éther, et l'alcool à 95°, c'est ce dernier qui nous a paru fournir la meilleure extraction, résultat obtenu plus rapidement à chaud qu'à froid. D'autre part, bien que nous ayons constaté que la bilirubine est mieux entraînée en milieu alcalin par l'alcool ammoniacal qu'en milieu acide par l'alcool acétique, nous avons cependant donné la préférence à l'extraction en milieu acétique, car la stercobiline est beaucoup mieux extraite dans ce dernier milieu.

Le sulfate de cuivre en solution aqueuse à 2 p. 1.000 est un réactif simple et de préparation facile. Sa conservation est bonne, contrairement à celle de certains autres réactifs tels que l'eau oxygénée; par rapport au perchlorure de fer, à l'iode, etc., il offre le grand avantage de ne pas avoir de coloration propre trop intense, qui gênerait une lecture colorimétrique.

Il nous a paru désirable d'obtenir un milieu limpide infiniment plus favorable à la lecture colorimétrique que le milieu trouble et opaque. La séparation du filtrat en deux tubes nous permet de juger la réaction en fonction de la coloration témoin du liquide extractif. En effet, ce liquide contient toujours une quantité variable de pigments d'origine alimentaire, qui viennent se superposer aux colorations spécifiques. Cette précaution donne à la méthode une sensibilité plus grande et nous permet de déceler la présence de faible quantité de pigments de l'ordre d'un milligramme p. 1.000.

Enfin, la possibilité d'affirmer la présence simultanée de bilirubine et de stercobiline peut, dans certains cas cliniques, rendre des services appréciables.

Nous avons étudié les résultats fournis par notre méthode personnelle comparativement à ceux obtenus par les techniques classiques. Voici, sous forme de tableau, quelques-uns de ces résultats :

Analyses	Solution saturée de sublimé	Sublimé acétique	Acétate de zinc	$FeCl_3$	Méthode personnelle
1	Réaction lente, mais nette. Précipité rose.	Réaction lente. Coloration rose. Précipité rose.	Fluorescence très nette.	Coloration rose faible.	Coloration rose instantanée.
2	Réaction au bout de 24 h. négative.	Après 24 heures, négative.	Négative.	Négative.	Présence de bilirubine. Coloration verte instantanée.
3	Réaction douteuse.	Réaction douteuse.	Réaction très faible.	Coloration rose faible.	Réaction faible, mais coloration rose décelée grâce au tube témoin.
4	Coloration rose faible.	Illisible.	Positive.	Coloration rose.	Coloration rose. Coloration verte différenciée par notre technique.
5	Coloration rose en 10 minutes	Négative.	Positive.	Coloration rose	Coloration rose franc. Lecture nette instantanée.

C. — Application à la recherche de la bilirubine dans les liquides organiques.

Bien que nous ayons volontairement limité notre étude au domaine de la coprologie, nous signalerons cependant que nous avons cherché à connaître la valeur de notre réactif au sulfate de cuivre pour la recherche de la bilirubine dans divers liquides organiques : urine, liquide céphalo-rachidien, liquide gastrique. Nous avons utilisé la méthode clinique employée par G. Denigès, L. Chelle et A. Labat [51] en substituant au nitrite de sodium le sulfate de cuivre. L'oxydation du pigment est moins brutale avec notre réactif : on obtient une coloration verte, tandis qu'elle est souvent poussée jusqu'au terme bilicyanine avec le nitrite de sodium dans le même laps de temps. La sensibilité de ces deux réactifs nous paraît être égale et les résultats obtenus tout à fait comparables. Voici le mode opératoire que nous avons suivi.

Technique. — « On met dans un verre à pied de 20 à 50 cm³ d'urine, puis 1 cm³ de la solution à 10 p. 100 (compté anhydre) de chlorure de calcium, et, en agitant, on verse goutte à goutte une solution de carbonate de soude à 10 p. 100 (compté anhydre), jusqu'à obtention d'un trouble léger et persistant. On ajoute alors 1 cm³ de la solution de carbonate de soude, puis on agite et on filtre sur un filtre sans plis. On lave à l'eau distillée le précipité, puis, après égouttage, on verse 4 cm³ d'acide acétique cristallisable et VI gouttes de la solution de sulfate de cuivre à 2 p. 1.000 sur le précipité, qui est dissous et entraîné. Le filtre et le filtrat se colorent en vert d'autant plus intense qu'il y a plus de bilirubine. On chauffe légèrement, car la chaleur douce favorise la réaction. »

CHAPITRE III

RECHERCHE QANTITATIVE DES PIGMENTS BILIAIRES DANS LE MECONIUM ET LES SELLES DE NOURRISSONS

Les méthodes de dosage de la bilirubine dans le méconium et dans les selles de nouveau-nés ne sont pas nombreuses. Il ne semble pas que les auteurs français se soient attachés à l'étude de la question, bien qu'il ait été proposé des méthodes de dosage de la stercobiline dans les selles des adultes. Le plus ancien travail sur le sujet qui nous occupe a été publié par l'Allemand Ylppö en 1913.

A. — Méthodes successivement proposées.

Ces méthodes utilisent les mêmes réactifs que les techniques de recherche qualitative, et nous pouvons les séparer en trois groupes :

1° Méthode spectrophotométrique simple;
2° Méthodes par azoréaction;
3° Méthode d'oxydation.

Nous rapporterons ici les techniques originales successivement proposées et nous en ferons la critique.

I. — Méthode spectrophotométrique simple. Méthode de A. Ylppö [100].

Cet auteur dose la somme bilirubine plus biliverdine au colorimètre photoélectrique dans le liquide extractif chloroformique de la matière fécale préalablement dégraissée par l'éther.

Réactifs :

1° Ether;
2° Acide chlorhydrique 0,1 N;
3° Chloroforme.

Technique. — « Faire sécher les selles le plus rapidement possible sur un bain-marie d'eau bouillante et les pulvériser. Prendre un à deux grammes de selle (suivant la teneur en graisse), les rouler dans un petit papier filtre souple et introduire le tout dans un soxhlet. Traiter la poudre fécale par l'éther jusqu'à épuisement des graisses. Les matières fécales sont alors portées dans une large capsule en porcelaine (contenant environ 500 cm^3) et recouvertes par 100 cm^3 d'acide chlorhydrique 0,1 N chaud. Les sels de bilirubine et de biliverdine sont ainsi déplacés. Chauffer jusqu'à ébullition en mettant la capsule sur une toile métallique et agiter pendant environ deux minutes afin que les fines particules de fèces ne puissent pas s'agglomérer entre elles. Refroidir ensuite avec environ 250 cm^3 d'eau froide et laisser reposer une heure. Pendant ce temps, la bilirubine et la biliverdine, qui en chauffant se sont dissoutes en partie, floculent petit à petit en solution acide. Filtrer à travers un filtre à plis (filtration difficile). Quand tout est passé, laver à l'eau chaude jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Sécher lentement à l'air (et non à la chaleur, qui fait apparaître de petits grains d'une dureté pierreuse qui rendent impossible une extraction complète par le chloroforme). Le filtre et le résidu, qui est étendu de façon aussi mince et régulière que possible, sont portés dans un soxhlet de 50 à 75 cm^3. Verser du chloroforme et porter le tout sur un bain de sable pendant trois à quatre heures (on doit ajouter de temps en temps du chloroforme pour rendre l'extraction plus active). Porter l'extrait chloroformé, suivant son intensité de coloration, dans un ballon jaugé de 50 à 100 cm^3, puis compléter jusqu'à la marque par du chloroforme. On dose les pigments, par extinction, au spectrophotomètre de König-Mastens et Grünbaum [101] à 493 $m\mu$ et à 538 $m\mu$. Le résultat obtenu est toujours multiplié par 1,5. »

Critique. — Cette technique de A. Ylppö nous paraît fort longue et ses nombreux temps peu favorables à l'obtention d'un résultat précis. En effet, la dessiccation des selles sur un bain-marie, le dégraissage par l'éther et le traitement à l'ébullition même pendant deux minutes en milieu fortement chlorhydrique ne permettent pas, à notre avis, d'obtenir une grande précision. Nous avons constaté de plus, par l'expérience, que le chloroforme n'est pas le meilleur solvant de la bilirubine, car l'alcool ammoniacal lui est bien supérieur. Ylppö, d'ailleurs, fait la remarque suivante : « La bilirubine est unie de façon si étroite à d'autres constituants de la selle qu'une extraction totale des pigments biliaires par le chloroforme n'est que rarement obtenue par une seule extraction. » Aussi les résultats doivent-ils être multipliés par 1,5 pour essayer de compenser les erreurs de technique.

Notons enfin que Ylppö fait son dosage aux longueurs d'onde de 538 mμ et 493 mμ et qu'il estime que sa méthode n'est pas faussée par les corps qu'a pu entraîner le chloroforme en même temps que les pigments biliaires. L'auteur donne comme quantité de bilirubine trouvée dans les selles des nourrissons, pour les quinze premiers jours de vie, de 120 à 160 mg. par vingt-quatre heures.

II. — Méthodes par azoréaction.

a) Méthode de E. Meyer et Alder [102].

Principe. — Cette méthode, parue en 1924, est une application de la réaction de Ehrlich, utilisée couramment dans les analyses de sang et d'urine. Elle est basée sur la propriété que possèdent les amines aromatiques, et par conséquent la bilirubine, de donner des dérivés azoïques colorés avec l'acide sulfanilique et le nitrite de sodium.

Réactifs :

1° Alcool à 95°;

2° Ammoniaque;

3° Diazoréactif :

10 cm³ de (α);

VI gouttes de (β).

α. Acide sulfanilique	5 g.
Acide chlorhydrique	15 cm³
Eau distillée	985 cm³
β. Nitrite de sodium.....	5 g.
Eau distillée	1.000 cm³

4° Solution saturée de sulfate d'ammonium;

5° Acide chlorhydrique concentré.

Technique. — « Broyer 0,5 g. de matière fécale dans un mortier avec 2,5 cm³ d'alcool et II gouttes d'ammoniaque jusqu'à homogénéité. Prélever 0,5 cm³ de dilution fécale et les mettre dans un tube à centrifuger avec 1 cm³ de diazoréactif. Après copulation, ajouter 3,5 cm³ de sulfate d'ammonium. Centrifuger.

» Prélever 4,5 cm³ du liquide limpide et les porter dans un tube du colorimètre avec 0,5 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On obtient un virage vers le violet. Comparer cette coloration obtenue à l'échelle de Grau. Faire les calculs au moyen de la courbe de Eichungs, et le chiffre trouvé sera multiplié par 144. »

Les auteurs ajoutent : « Cette méthode n'a pas la prétention d'une exactitude quantitative absolue, mais elle n'est nullement plus inexacte que les autres méthodes employées. »

Résultats. — L'élimination de la bilirubine chez le nouveau-né oscille, d'après Meyer et Alder, entre 500 et 5.000 mg. de bilirubine dans les selles de vingt-quatre heures.

Critique. — Les dilutions successives auxquelles sont soumises les selles nous paraissent constituer un important inconvénient, car le chiffre obtenu doit être multiplié par le coefficient 144, ce qui augmente considérablement l'erreur initiale. En fait, les chiffres mentionnés par ces auteurs sont très élevés, si on les compare à ceux fournis par les autres

techniques que nous exposons. Nous avons pensé qu'ils pouvaient être expliqués en partie par la présence dans le liquide extractif de corps susceptibles de fournir une diazoréaction positive, dont l'action vient se superposer à celle de la bilirubine : les composés d'oxydation de la tyrosine, de l'histidine, de corps à noyaux imidazol, sont dans ce cas. Ces considérations font que nous restons réservé quant à la précision des résultats obtenus par cette méthode.

b) Méthode de T. K. With [31].

Dans sa publication de 1942, T. K. With s'exprime en ces termes : « En recherchant une méthode utilisable pour les selles de nouveau-nés, nous avons d'abord essayé de broyer en une poudre sèche la selle dans un mortier avec du sulfate de soude anhydre et d'extraire la bilirubine au soxhlet au moyen de chloroforme ou d'alcool, après acidification par l'acide acétique glacial. Par ce procédé, on réussit à retenir seulement une petite partie de la bilirubine; même après une manipulation de plusieurs heures, la poudre de selle était toujours clairement jaune et devenait rouge vif avec un réactif diazo en milieu alcoolique. Puisque l'extraction de la bilirubine elle-même n'est alors pas possible, nous avons cherché à la diazoter dans les selles et à extraire l'azobilirubine. »

Réactifs :

1° Acide acétique glacial;
2° Sulfate de soude anhydre;
3° Alcool éthylique à 95°;
4° Diazoréactif : 10 cm³ (α) + VI gouttes (β).
5° Acide nitrique concentré.

α. Acide sulfanilique ..... 5 g.
Acide chlorhydrique ..... 15 cm³
Eau distillée ..... q. s. p. 1.000 cm³
β. Solution de nitrite de sodium à 0,5 g. p. 100.

Technique. — « Environ 50 cg. de selle sont pesés et placés dans un mortier (diamètre d'environ 20 cm.). On ajoute quelques gouttes d'acide acétique glacial ainsi que quelques grammes de sulfate de soude anhydre. On broie ensuite jusqu'à ce que la masse devienne une poudre sèche et autant que possible homogène. On détache avec une spatule les croûtes qui ont pu se former sur le côté et le fond du mortier. On ajoute ensuite 10 à 15 cm³ d'alcool à 96° et 1 cm³ du diazoréactif. On agite énergiquement avec une spatule, après quoi apparaît une couleur rouge dans le cas où il y a de la bilirubine. Environ une minute après, on décante le liquide se trouvant au-dessus de la poudre sur un filtre en papier dans un petit ballon. On répète la même manœuvre avec environ 10 cm³ d'alcool et 0,5 à 1 cm³ de diazo et on continue jusqu'à ce que l'on n'obtienne plus de couleur rouge. On met ensuite le filtre et la poudre dans un mortier et on les traite avec 10 cm³ d'alcool et 1 cm³ de diazo pour extraire ce qui resterait. On fait régulièrement trois à cinq extractions, mais sept à dix pour des selles riches en bilirubine. On mesure ensuite tous les extraits et l'on dilue éventuellement avec de l'alcool pour avoir un volume en chiffre rond, par exemple 100 cm³. Enfin, on ajoute III gouttes d'acide nitrique concentré; il apparaît alors une belle couleur bleue. On ne doit plus ajouter d'acide chlorhydrique, car de fins précipités troubleraient la mesure. On dose au photomètre de Pulfrich avec le filtre S 57 (0,5, 1 ou 2 cm. d'épaisseur de couche selon l'intensité de la couleur). On calcule la concentration en milligrammes pour 100 cm³ de la solution mesurée : c = E cm. × 0,685, et de là on calcule la concentration en milligrammes par gramme de matière fécale. »

L'auteur fait suivre sa technique des remarques suivantes : « Cette méthode doit assurer une extraction quantitative, car on extrait jusqu'à ce que l'on n'obtienne plus de couleur. En outre, on voit que la poudre, primitivement jaune ou verte, devient incolore ou grise après une extraction complète, car non seulement la couleur jaune disparaît pendant l'extraction,

mais aussi la couleur verte; on extrait, en effet, la biliverdine en même temps que la bilirubine. Les pertes ne peuvent être que minimes, car la bilirubine est très stable dans les selles de nouveau-nés et l'extraction l'amène rapidement dans la substance colorée azostable.

» On vérifie la précision de la méthode au moyen de deux analyses consécutives : on trouve les extinctions suivantes : 0,572 et 0,563 — 1,03 et 1,00 — 0,372 et 0,351 — 0,690 et 0,721 — 0,462 et 0,430. On voit que les valeurs particulières diffèrent au maximum 5 p. 100 de la valeur moyenne.

» On analyse ensuite de nouveau les quatre derniers échantillons après les avoir placés vingt-quatre heures à la glacière dans des tubes bouchés. Ils donnent les extinctions suivantes : 0,998 — 0,357 — 0,703 — 0,430; de telle sorte que l'on peut conclure qu'aucune perte sensible n'est intervenue pendant ce temps.

» Mentionnons que la couleur de l'extrait de la selle acidulée est toujours — ou presque toujours — bleu franc, comme on le voit pour les diazosolutions de bilirubine pure. Les extraits de méconium, cependant, font exception; après l'acidification, en effet, ils deviennent rougeâtres, et non bleu franc, comme à l'ordinaire. »

Résultat. — With accuse une élimination de 35 à 125 mg. de bilirubine dans l'ensemble des selles chez le nouveau-né par vingt-quatre heures.

Critique. — Cette méthode est la plus récente, puisqu'elle a été publiée en 1942; elle n'avait pas encore été traduite en français.

La partie la plus intéressante est son extraction, qui a été particulièrement bien étudiée, et qui donne entière satisfaction. With, d'ailleurs, n'insiste pas assez, à notre avis, sur le rôle du sulfate de soude, qui permet, comme l'a montré Varela [13], d'extraire tout le pigment biliaire. Elle offre l'inconvénient d'utiliser une diazoréaction, mais donne cependant des résultats beaucoup plus justes que la technique de Meyer et Alder.

Notons également avec l'auteur que cette technique n'est pas utilisable pour le méconium, ce qui lui enlève un peu de son intérêt, mais, néanmoins, elle reste parmi les meilleures connues à ce jour.

III. — Méthode de dosage par oxydation de la bilirubine.

Les méthodes d'oxydation sont, en général, considérées comme plus exactes que celles basées sur une azoréaction. En effet, cette dernière n'est pas spécifique de la bilirubine, ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, et divers corps donnent des composés de copulation colorés, qui peuvent gêner le dosage du pigment biliaire.

Méthode de H. T. Malloy et K. A. Evelyn [80].

Dans le travail publié en 1938 par ces auteurs canadiens, l'exposé de la technique est précédé d'une étude spectrophotométrique de la bilirubine et de ses divers produits d'oxydation que nous reportons ici : « Dans cet article est présentée une comparaison de trois réactifs actuellement employés pour le dosage de la bilirubine dans la bile, en même temps qu'une méthode dans laquelle un de ces réactifs est employé pour le dosage de la bilirubine dans la bile, les selles de nouveau-nés et le méconium avec le colorimètre photoélectrique. »

Etudes spectrophotométriques. — « Les courbes d'absorption résultant de l'action d'un réactif d'oxydation sur la bilirubine sont présentées dans la figure 4. Les variations successives du jaune au bleu, en passant par le vert jaune, le vert et le vert bleu, ne montrent aucune courbe stable jusqu'à ce que la couleur bleue soit obtenue. La couleur bleue, cependant, reste stable à la température de la pièce pendant un temps considérable avant le démarrage final de l'oxydation.

» La présence d'un même point idéal pour toutes les courbes à 322 mμ étaie la théorie de E. A. Peterman et E. B. Cooley [103], que la couleur verte de la prétendue biliverdine est, en réalité, un mélange de bilirubine jaune et de bilicyanine bleue en proportion variable.

» Dans la présente méthode, les mesures d'absorption de la lumière sont faites au colorimètre photoélectrique avec un filtre rouge (courbe F, fig. 4), qui ne laisse passer la lumière que dans la région de l'absorption maxima de la couleur bleue stable. Non seulement l'emploi d'un tel filtre augmente la sensibilité de la méthode, mais aussi il élimine le trouble produit par des pigments étrangers jaunes et bruns, dont l'absorption à l'extrémité rouge du spectre est négligeable. Ces pigments, cependant, sont une source grave d'erreur dans les mesures visuelles sur les selles, puisqu'ils changent la couleur bleue en diverses nuances de vert qui ne peuvent être comparées à aucune gamme étalon artificielle. »

Nous avons reproduit ci-dessous les courbes données par ces auteurs.

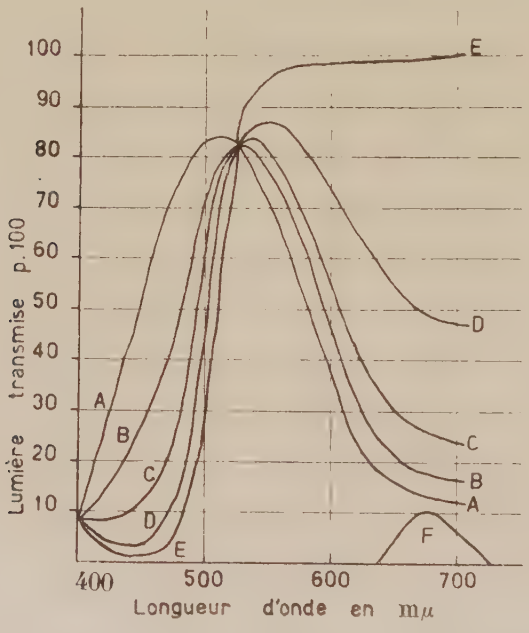


Fig. 4. — Courbes spectrophotométriques des produits d'oxydation de la bilirubine.

Courbe E, bilirubine seule. Courbe A à B, bilirubine + réactif d'oxydation. Courbe D vert jaune, 2 minutes après addition

du réactif. Courbe C vert, 5 minutes. Courbe D vert bleu, 10 minutes. Courbe A, bleu, 20 à 200 minutes. Courbe F, filtre 660. « Ces courbes sont faites avec un réactif d'oxydation à base d'acide nitrique, mais la même série de couleurs est obtenue exactement avec l'eau oxygénée, bien que le temps qui s'écoule entre le changement de couleur varie grandement avec la nature et la concentration du réactif d'oxydation. Les couleurs violette et jaune terminales ne sont pas montrées. »

Choix d'un réactif d'oxydation. — H. T. Malloy et K. A. Evelyn ont choisi leur réactif d'oxydation d'après l'étude suivante. La figure 5 montre l'effet de trois réactifs d'oxydation différents sur le développement de la couleur bleue mesurée au colorimètre photoélectrique avec le filtre 660.

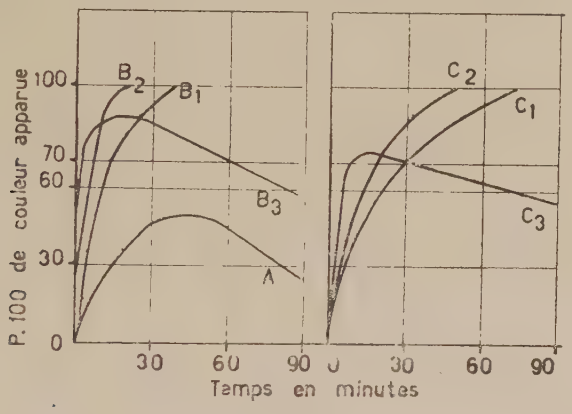


Fig. 5. — Influence de la nature de la concentration du réactif d'oxydation sur le développement de la couleur bleue.

Concentration de la bilirubine, 0,002 mg. par 10 cm³.

Courbe A : 2 cm³ de solution de bilirubine, 7 cm³ d'acide acétique cristallisable en parties égales avec alcool éthylique à 94°, 0,5 cm³ de persulfate d'ammonium. Ce réactif est une légère modification de celui employé par C. R. Schmidt, K. K. Jones et A. C. Yvy [67].

Courbes B_1, B_2, B_3 : 2 cm³ de solution de bilirubine, 3 cm³ d'alcool, 5 cm³ de réactif. *Réactif B_1 :* 0,2 cm³ d'eau oxygénée

à 30 p. 100, 1 cm³ d'acide chlorhydrique concentré dans 100 cm³ d'alcool éthylique à 94°. *Réactif* B_2 : 2 fois plus concentré que B_1. *Réactif* B_3 : 4 fois plus concentré que B_1. Le réactif B_3 donne des conditions presque identiques à celles recommandées par E. A. Peterman et E. B. Cooley [103].

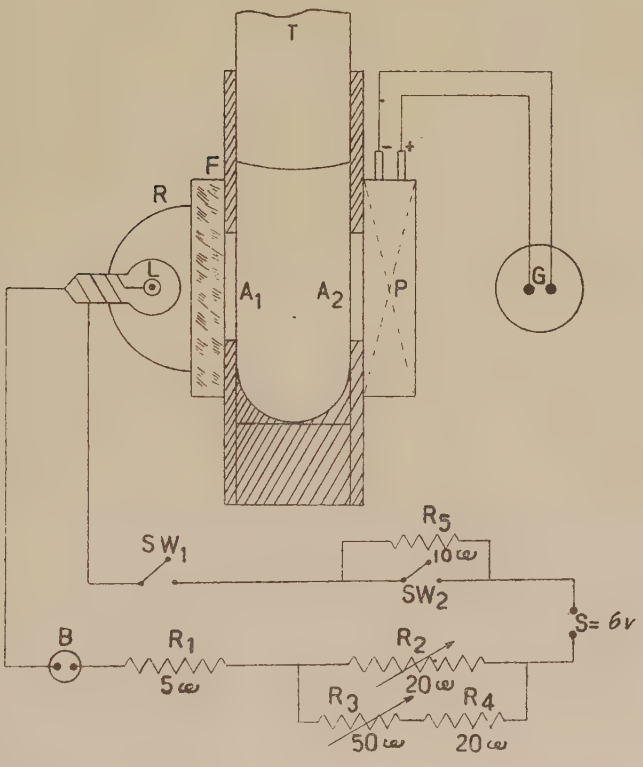
Courbes C_1, C_2, C_3 : 2 cm³ de solution de bilirubine, 3 cm³ d'alcool, 5 cm³ de réactif. Dans chaque cas, on a laissé reposer le réactif pendant une semaine avant de l'employer. Les réactifs à base d'acide nitrique frais sont beaucoup plus lents.

Réactif C_1 : 0,4 cm³ d'acide nitrique concentré, 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré dans 100 cm³ d'alcool éthylique à 94°. *Réactif* C_2 : 2 fois plus concentré que C_1. *Réactif* C_3 : 4 fois plus concentré que C_1. Le réactif C_2 donne des conditions presque identiques à celles recommandées par K. Sribhishaj, W. B. Hawkins et G. H. Wipple [104].

« Le persulfate d'ammonium (courbe A), autrefois employé pour mesurer le jaune terminal de l'oxydation de la bilirubine, est nettement inadéquat pour mesurer la couleur bleue. Les phases initiales de l'oxydation sont inutilement prolongées, tandis que les phases terminales ont lieu si rapidement que la couleur bleue n'est que passagère. C'est cependant une source de satisfaction de noter que des réactifs d'oxydation aussi différents que l'eau oxygénée et l'acide nitrique concentré produisent les mêmes quantités de couleur bleue stable à leur concentration optima. Nous avons choisi l'eau oxygénée comme réactif d'oxydation pour la présente méthode à cause de sa plus grande rapidité à produire les couleurs, spécialement dans le dosage de la bilirubine dans la bile et dans les selles; alors que l'acide nitrique demande vingt à quarante heures, l'eau oxygénée agit presque aussi rapidement qu'avec la bilirubine pure (fig. 5). L'eau oxygénée a pour avantage d'être relativement stable, bien qu'il faille la garder dans une bouteille de couleur foncée dans l'appareil frigorifique et la préparer environ une fois par mois. Aucune diminution sensible de son efficacité ne peut être notée pendant ce laps de temps. »

COLORIMETRE PHOTOELECTRIQUE D'EVELYN

D'APRÈS L'AUTEUR



Coupe transversale montrant le circuit électrique de l'appareil.

A_1, A_2 : Ouverture rectangulaire de 1 pouce de haut sur 7/16 de pouce de large; *B* : Borne permettant d'isoler la lampe ou de la mettre en circuit. *F* : Filtre coloré; *G* : Galvanomètre. *L* : Ampoule de lampe de poche Mazda n° 31. *P* : Cellule photoélectrique à couche d'arrêt. *R* : Réflecteur en aluminium diamètre 1,5 pouce. R_1 à R_5 : Résistance de contrôle. *S* : Source électrique de 6 volts : accumulateur, pile ou transformateur. S_{W_1} : Interrupteur principal de la lampe. S_{W_2} : Interrupteur permettant d'alimenter la lampe sous une tension plus basse. *T* : Tube à essais en verre mou calibré à 7 × 7/8 de pouce.

Après cette étude, H. T. Malloy et K. A. Evelyn exposent, en détail, la méthode suivante :

Réactifs. — 1° Réactif d'oxydation : 0,4 cm³ d'eau oxygénée à 30 p. 100 + 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré dans 100 cm³ d'alcool éthylique à 94°.

2° Alcool éthylique à 94°.

Technique. — « Un prélèvement de méconium ou de selle de nouveau-né ne remontant pas à plus de vingt-quatre heures est placé dans un bécher et dilué avec 200 cm³ à 500 cm³ d'eau distillée. Agiter avec un agitateur mécanique pendant trois à cinq heures jusqu'à ce qu'il en résulte une émulsion homogène.

» L'essentiel de ce procédé consiste à obtenir une suspension extrêmement fine de particules de selles. Après avoir mesuré le volume total, une portion, par exemple, de 10 cm³ est placée dans un tube à centrifuger de 50 cm³ additionnée de 15 cm³ d'alcool et de 25 cm³ de réactif oxydant. On agite énergiquement la solution; on l'abandonne ensuite une heure et on centrifuge; on verse le liquide surnageant et on le laisse reposer en attendant de pratiquer une seconde extraction. Le précipité est séché en renversant le tube sur du papier filtre pendant quelques minutes; on ajoute encore 25 cm³ de réactif d'oxydation et on agite énergiquement la solution. On la laisse reposer une heure, puis on la filtre et on la verse dans un tube colorimétrique. Une partie du premier liquide surnageant est filtrée et versée dans un second tube. On fait enfin une lecture des deux tubes au colorimètre, muni du filtre 660 [105], avec l'alcool comme compensateur. Le liquide surnageant de la première extraction, spécialement pour le méconium, peut sembler vert plutôt que bleu à cause de la présence de pigments étrangers bruns, mais il a déjà été signalé que le filtre 660 n'est pas affecté par ces pigments et mesure seulement la couleur bleue.

» Nous avons trouvé nécessaire cette double extraction des prélèvements de méconium et de selles, puisque, dans notre expérience, la première n'avait pu extraire qu'environ 80 p. 100 de la bilirubine. »

Calculs. — « La quantité de bilirubine en milligrammes contenue dans le premier échantillon est obtenue à partir de la formule :

$$\frac{2 - \log G}{K_1} \times \frac{V}{A} \times S \text{ mg.}$$

dans laquelle G est la lecture du galvanomètre, K_1 la constante d'étalonnage, V le volume de la solution colorée, A la portion de l'échantillon original employé, et S le volume total de l'échantillon original. On a trouvé que la constante d'étalonnage déterminée avec la bilirubine pure Hoffmann La Roche était de 78,0, ainsi, pour le méconium ou les selles, si l'émulsion pour vingt-quatre heures était de S cm³, la quantité totale de bilirubine de la première extraction serait :

$$\frac{2 - \log G_1}{78{,}0} \times \frac{50}{10} \times S \text{ mg.}$$

et pour la deuxième extraction :

$$\frac{2 - \log G_2}{78{,}0} \times \frac{50}{10} \times S \text{ mg.}$$

» Si on accepte la convention habituelle, qui consiste à écrire :

$$2 - \log G = 7$$

et d'additionner les résultats obtenus de la première et de la deuxième extraction, nous trouvons comme quantité totale de bilirubine :

$$\frac{1}{78} \times \frac{50}{10} \times S \times (L1 + L2) \text{ mg.} »$$

Résultats. — Avec cette technique, on peut doser jusqu'à 0,5 mg. de bilirubine par litre. A notre grand regret, nous n'avons pu relever dans l'article original des auteurs les résultats rapportés à l'élimination de la bilirubine par vingt-quatre heures.

Pour vérifier la précision de leur méthode, H. T. Malloy et K. A. Evelyn ajoutent de la bilirubine pure dans un échan-

tillon de selles déjà dosé. Ils effectent alors un nouveau dosage et établissent le rapport qui existe entre le chiffre obtenu et celui que l'on devrait trouver théoriquement. Les résultats révèlent que l'écart entre les chiffres théoriques et pratiques est minime.

Relation entre la bilirubine calculée et la bilirubine trouvée.

Les chiffres représentent des microgrammes de bilirubine par 10 cm³ de solution colorée.

Matière	Bilirubine déterminée dans l'éch.	Bilirubine ajoutée	Bilirubine totale calculée	Bilirubine totale trouvée	Rapport
Selles	2,55	2,53	5,13	5,00	97,6
	2,55	1,72	4,27	4,20	98,5
	2,55	3,44	5,99	5,73	95,7
	1,27	1,72	2,99	3,10	103,7
	5,30	1,72	7,02	7,00	99,7

Ce tableau montre que la bilirubine peut être déterminée dans les selles ou dans le méconium avec une erreur en plus ou en moins de 5 p. 100.

Critique. — Ce remarquable travail apporte une méthode de grande valeur et de haute précision. Il n'entre pas dans nos desseins de la critiquer. Mais elle trouve une application difficile en clinique en raison de sa complexité et de sa lenteur; en effet, il faut homogénéiser les selles pendant trois à quatre heures à l'agitateur mécanique, puis attendre la formation du deuxième terme d'oxydation de la bilirubine, la bilicyanine, ce qui nécessite une nouvelle perte de temps d'environ une heure.

Nous nous sommes proposé de mettre au point une technique, non pas destinée à supplanter cette dernière, mais simplement à la remplacer honorablement dans le cours des recherches cliniques journalières.

B. — Remarques préliminaires sur l'étude spectrophotométrique de la bilirubine.

Avant l'exposé de notre technique de dosage de la bilirubine dans les selles et le méconium, nous reprendrons l'étude spectrophotométrique de la bilirubine et de ses divers produits d'oxydation faite par H. T. Malloy et K. A. Evelyn.

Dans la figure 1 donnée par ces auteurs, et que nous avons reproduite ci-dessus, H. T. Malloy et K. A. Evelyn considèrent que le point trouvé à 522 mμ, par où passent toutes les courbes de la bilirubine, non oxydée ou oxydée à des degrés divers, correspond à la formation de bilicyanine; la biliverdine ne serait pas un corps défini et la coloration verte résulterait d'une association de la couleur jaune de la bilirubine pure et de la couleur bleue de la bilicyanine (théorie de Peterman et Cooley [103]). Cette théorie ne peut plus être soutenue aujourd'hui, puisque H. Fischer a fait la synthèse de la bilirubine en passant par la biliverdine; dès lors on peut affirmer que l'oxydation de la bilirubine affecte la marche suivante :

bilirubine → biliverdine → bilicyanine → bilivionine.

En nous appuyant sur cette certitude et après une étude approfondie des courbes données par H. T. Malloy et K. A. Evelyn, nous avons pensé que nous pouvions émettre l'hypothèse que le point idéal rencontré à 522 mμ correspondrait, en réalité, à la biliverdine; celui de la bilicyanine serait rejeté entre 350 et 400 mμ dans l'ultra-violet, en un point vers lequel toutes les courbes tendent, ainsi que le montre le graphique. Ce deuxième point n'a d'ailleurs pas été expliqué par les auteurs.

Pour continuer l'étude de ces courbes dans l'ultra-violet, il nous aurait fallu des plaques photographiques spéciales, et surtout un photomètre, permettant de doser la densité optique des spectres obtenus à partir de la bilirubine pure et de ses divers produits d'oxydation. Il ne nous a pas été possible de nous procurer ce matériel.

Que ce point idéal à 522 mμ, par où passent toutes les courbes d'absorption, corresponde à la bilicyanine, selon l'opinion de H. T. Malloy et K. A. Evelyn, ou à la biliverdine, comme nous en émettons l'hypothèse, son existence permet d'affirmer qu'en utilisant cette seule longueur d'onde la valeur de la lumière transmise doit être indépendante de l'état d'oxydation du pigment. De la sorte, il serait possible de pratiquer le dosage d'une solution de bilirubine à n'importe quel moment, sans se préoccuper de son degré d'oxydation. La marche à suivre dans ce cas serait :

1° photographie sur plaque du spectre d'absorption d'une solution étalon de bilirubine pure;

2° photographie sur la même plaque et dans les mêmes conditions du spectre d'absorption de la solution à doser;

3° mesure comparative de la densité optique des deux spectres à la longueur d'onde de 522 mμ à l'aide d'un photomètre à éclairage puissant et à fente très étroite.

Bien qu'à priori cette technique nous paraisse devoir donner des résultats rigoureux, nous ne l'avons pas retenue en définitive, car elle n'aurait pu nous fournir, en raison des difficultés techniques de sa réalisation, la méthode clinique que nous recherchions.

Nous nous sommes contenté de nous rapprocher le plus possible, dans la pratique, de cette longueur d'onde idéale, et nous avons utilisé dans ce but le filtre 520 M d'Evelyn, qui ne laisse passer la lumière transmise qu'entre 470 mμ et 580 mμ. Dans ces conditions, le facteur temps reprend toute son importance et il ne nous restait plus, dès lors, qu'à étudier l'oxydation de la bilirubine en fonction du temps avec ce filtre. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Recherche au photocolorimètre du moment favorable au dosage de la bilirubine, dans la bande comprise entre 470 et 580 mμ, délimitée par le filtre 520 M d'Evelyn.

Milligrammes de bilirubine p. 1000	Bilirubine non oxydée	5 minutes après le début de l'oxydation	15 minutes après le début de l'oxydation	45 minutes après le début de l'oxydation	48 heures après le début de l'oxydation
10	125	117	116	117	90
20	117	86	85,5	86	57
30	113,5	65	64,5	63	33
40	111	49	48	47	21
50	109	38	38	37	14
60	106	30	29	29	12
70	104	23	21	22	10
80	103	18	17	19	7
90	101	14	13	13	6
100	98	11	8	9	4

L'oxydation a été obtenue dans tous les cas par addition à 9 cm³ d'une solution de bilirubine pure dans l'alcool à 95° de 1 cm³ d'acide chlorhydrique pur et de X gouttes de solution aqueuse de sulfate de cuivre à 2 p. 1.000.

Cette étude spectrophotométrique montre qu'avec le filtre 520 M il ne nous est pas permis de doser la bilirubine à n'importe quel moment de son oxydation : en effet, la valeur de la lumière transmise, mesurée dans les conditions d'expérience où nous nous sommes placé, varie en fonction du temps. Mais nous constatons que cette variation peut être considérée comme nulle entre la cinquième et la quarante-cinquième minute qui suivent le début de l'oxydation. C'est donc durant cette période que doit être effectué le dosage.

La figure suivante (fig. 6) est la transposition des résultats que nous avons portés au tableau ci-dessus sur un graphique.

Cette figure montre que nous avons affaire à trois courbes :

Courbe A : bilirubine pure;

Courbe B : bilirubine oxydée pendant un temps compris entre cinq minutes et quarante-cinq minutes;

Courbe C : bilirubine quarante-huit heures après le début de l'oxydation.

Si nous considérons ces trois courbes A, B, C, nous constatons que la première n'est pas favorable à une mesure précise en raison de son allure, qui tend rapidement vers l'horizontale. De la sorte, pour deux lectures très voisines (faible

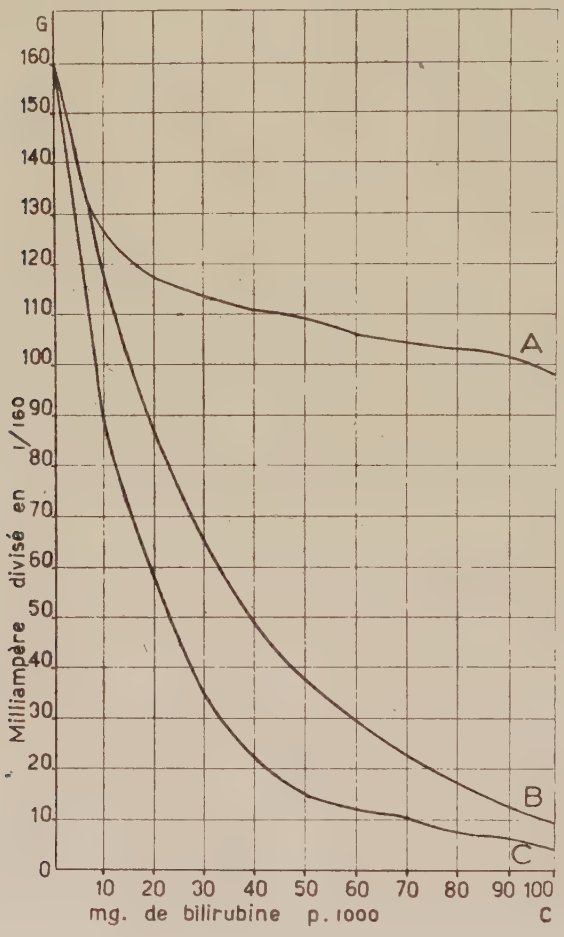


Fig. 6.

variation de G), les valeurs de bilirubine déterminées présenteraient de grands écarts (grande variation de C). La courbe C est à rejeter, car elle n'est obtenue qu'au bout de quarante-huit heures, ce qui allongerait inutilement la manipulation.

C'est donc la courbe B qui se révèle la plus favorable : plus favorable dans le temps, car elle se situe entre cinq et quarante-cinq minutes après début de l'oxydation; plus favorable aussi par son allure pour opérer un dosage précis (à de faibles variations de G correspondent de faibles variations de C). C'est donc elle qui servira de base à notre méthode.

Enfin, l'étude de la courbe B montre que la sensiblité du spectrophotomètre avec le filtre 520 M est d'environ 1 mg. de bilirubine par litre.

C. — Méthode personnelle.

Dans les diverses recherches que nous avons entreprises en vue de l'établissement d'une technique personnelle, nous avons été amené à rejeter les méthodes basées sur la diazoréaction. En effet, les selles contiennent de nombreux composés chimiques qui donnent avec le réactif des corps de copulation colorés, susceptibles de fausser les résultats.

Nous avons adopté, en conséquence, une méthode d'oxydation en nous servant du même réactif que nous avions utilisé pour la recherche qualitative des pigments biliaires dans les selles.

Principe. — Le principe de notre technique a été guidé par le souci de fournir une méthode rapide et aussi clinique que possible. Elle se rattache d'une façon étroite à la recherche qualitative, que nous avons exposée dans la deuxième partie de ce travail, et utilise les mêmes réactifs. L'appareil que nous avons employé a été construit par le Docteur Servantie. C'est un colorimètre photoélectrique très voisin de celui d'Evelyn [105]. Il possède la même gamme de filtres et ne diffère de celui-ci que par ses tubes calibrés, qui n'ont que 16 mm. de diamètre au lieu de 20, et son tambour, où un milliampère est divisé en 160 parties, alors qu'Evelyn ne le divise qu'en 100 parties.

Réactifs :

1° Sulfate de soude anhydre;
2° Alcool éthylique à 95°;
3° Ammoniaque;
4° Acide chlorhydrique pur;
5° Solution aqueuse de sulfate de cuivre à 2 p. 1.000.

Technique (I). — Prendre toutes les selles ou tout le méconium de vingt-quatre heures. Triturer la masse dans un mortier avec une quantité suffisante de sulfate de soude anhydre pour obtenir une poudre sèche et homogène. Détacher avec une spatule les croûtes qui se forment sur les parois du mortier. Peser le poids total du mélange fécal, soit : P grammes. En prendre B grammes (3 à 5 environ) et faire sur cette partie l'extraction de la bilirubine. Porter cette portion aliquote du mélange fécal dans un petit mortier en verre de 10 à 15 cm. environ de diamètre. Ajouter alors 10 cm³ d'alcool à 95° et 0,5 cm³ d'ammoniaque. Triturer cinq minutes pour faciliter le passage de la bilirubine dans l'alcool ammoniacal, puis acidifier en versant dans le mortier 1 cm³ d'acide chlorhydrique pur. Oxyder par X gouttes de solution de sulfate de cuivre. Bien triturer. Décanter les liquides sur un filtre en papier au-dessus d'un ballon jaugé de A cm³, en pratique de 50 à 100 cm³. Faire dans les mêmes conditions cinq à six autres extractions de l'alcool sur le même échantillon. Si le filtrat est trouble, repasser sur le filtre. On met ensuite le filtre et la poudre dans le mortier avec de l'alcool pour en extraire ce qui resterait.

Compléter le ballon jaugé à A cm³ avec de l'alcool à 95°.

Verser environ 10 cm³ de ce liquide extractif dans un tube calibré du colorimètre. On dose la lumière transmise au colorimètre photoélectrique muni du filtre 520 M avec l'alcool à 95° comme compensateur. Si la valeur de G est inférieure à 20, refaire le dosage en prenant moins de poudre fécale, ceci afin que la lecture du résultat soit faite dans la partie la plus sensible du galvanomètre.

Calculs. — La quantité de bilirubine en milligrammes contenue dans la selle de vingt-quatre heures est donnée par la formule :

$$\frac{2{,}204 - \log G \times A \times P}{K \times B \times 1.000} = Y \text{ milligrammes,}$$

où :

G = lecture)sur le tambour du colorimètre photoélectrique;

K = constante de l'appareil calculée pour la bilirubine = 0,013;

B = partie aliquote du mélange fécal utilisée pour le dosage;

P = poids total du mélange fécal;

A = dilution du liquide extractif;

Y = milligrammes de bilirubine éliminés par vingt-quatre heures.

Discussion. — Nous nous sommes attaché à mettre au point avant tout dosage une homogénéisation aussi complète que possible; celle que H. T. Malloy et K. A. Evelyn ont indiquée n'est pas, à notre avis, parfaite, ainsi que nous l'avons exposé plus haut. Rappelons que With, dans sa technique, n'en propose aucune. Le sulfate de soude anhydre, que nous avons choisi, déshydrate, en même temps qu'il homogénéise la selle. En une seule opération, nous obtenons ainsi les deux effets recherchés.

L'extraction du pigment du milieu fécal a retenu tout particulièrement notre attention et a fait l'objet de nombreux soins. Nous avons successivement passé en revue tous les solvants de la bilirubine; c'est l'alcool à 95° en milieu alcalin qui s'est révélé le meilleur. Nous avons préféré l'alcool ammoniacal à l'alcool sodé, après avoir noté une stabilisation plus grande du pigment dans le premier solvant. Pour prévenir les critiques faites par plusieurs auteurs, notamment Brulé et N. Garban [106] sur les différents modes d'extraction des pigments dans les selles, nous avons fait des azoréactions sur le résidu fécal, et n'avons jamais noté de coloration. Signalons, après With, que le chloroforme, bien qu'il

ait été souvent proposé comme solvant, n'est pas le meilleur, et que l'alcool ammoniacal lui est bien supérieur.

L'oxydation en milieu chlorhydrique provoquée par une solution de sulfate de cuivre n'est pas assez brusque pour que l'on puisse supposer qu'une partie de la bilirubine contenue dans les selles soit détruite. Son action lente nous a permis de doser, comme le montre notre technique, la bilirubine au début de son oxydation et dans un laps de temps assez grand de cinq à quarante-cinq minutes sans que les erreurs obtenues soient supérieures à celles inhérentes au fait même de la manipulation d'une telle substance : environ 2 p. 100 de la valeur de la quantité de bilirubine par litre de solution.

Enfin, cette technique a la supériorité, sur celle de With, d'être valable aussi bien pour les selles que pour le méconium.

Si nous avons opéré dans la bande comprise entre 470 et 580 mμ avec le filtre 520 M d'Evelyn en négligeant les pigments étrangers d'origine alimentaire, comme les carotènes, c'est que nous estimons que, dans la grande majorité des cas, le dosage de la bilirubine ne sera effectué que sur des selles provenant de nourrissons âgés de 7 mois au plus. L'alimentation de tels sujets, étant exclusivement lactée, ne peut être une source abondante de pigments susceptibles de venir troubler le résultat.

Pour vérifier la valeur de notre méthode, nous avons fait des dosages avant, puis après addition d'une quantité de bilirubine connue, ce qui semble être le meilleur test de vérification, test d'ailleurs utilisé par H. T. Malloy et K. A. Evelyn.

Relation entre la bilirubine calculée et la bilirubine trouvée par expérience.

Matière	Bilirubine déterminée en mg. par g /selles	Bilirubine ajoutée en mg. par g./selles	Bilirubine totale en mg. calculée	Bilirubine totale en mg. trouvée	Rapport
Selles n° 1.	2,93	0,5	3,43	3,40	98,5
— n° 2.	0,33	0,5	0,83	0,90	108,4
— n° 3.	1,55	0,7	2,25	2,17	96,4
— n° 4.	1,30	0,4	1,70	1,82	93,3
— n° 5.	0,93	0,6	1,43	1,33	106,8

Ce tableau nous permet de constater que les résultats obtenus sont sensiblement équivalents à ceux des auteurs canadiens. Le rapport entre le chiffre théorique et le chiffre pratiquement trouvé montre que le dosage de la bilirubine est déterminé avec une approximation satisfaisante. En effet, l'écart entre ces deux chiffres ne dépasse pas 8 p. 100 en plus ou en moins.

La méthode que nous proposons présente donc l'avantage d'être rapide, puisqu'en trente minutes nous pouvons fournir le résultat du dosage, elle met en jeu des réactifs faciles à préparer et d'une stabilité indéfinie; elle utilise, enfin, le matériel normal d'un laboratoire d'analyses biologiques.

Dans le but de réduire l'importance du prélèvement fécal, nous avons été amené à étudier la différence que l'on pourrait trouver entre le dosage fait sur un échantillon prélevé dans la selle avant homogénéisation et celui fait sur un échantillon prélevé après l'homogénéisation de la selle totale.

Voici la deuxième technique que nous avons utilisée dans ce but.

Technique (II). — Peser la selle entière : soit P grammes. Puis prendre p grammes de matière fécale, environ 0 g. 50. Les porter dans un mortier en verre de 10 à 15 cm. de diamètre. Ajouter alors environ 10 cm³ d'alcool à 95° et 0,5 cm³ d'ammoniaque. Continuer l'opération comme dans la technique indiquée précédemment.

Calcul. — La quantité de bilirubine en milligrammes par vingt-quatre heures est donnée par la formule :

$$\frac{2{,}204 - \log G \times P \times A}{K \times 1.000 \times p} = Y \text{ milligrammes,}$$

où :

G = lecture sur le tambour du galvanomètre;
P = poids total de la selle en vingt-quatre heures;
A = dilution finale du liquide extractif;
p = poids de l'échantillon prélevé;

K = constante de l'appareil calculée pour la bilirubine : 0,013;

Y = milligrammes de bilirubine éliminés par vingt-quatre heures.

Nous avons pratiqué comparativement cette technique et la précédente sur plusieurs selles. Voici quelques-uns de ces résultats comparatifs :

Selles	Technique n° 1	Technique n° 2	Rapport
1	6,1	5,5	10 %
2	10,75	11,6	7,7 %
3	50,5	54	7 %
4	21	19	10 %
5	36,4	39	7,6 %

Ces résultats montrent que notre deuxième technique, qui est plus simple et plus rapide que la première, donne des résultats à peu près identiques, le coefficient d'erreur ne dépasse pas 10 p. 100.

C'est donc ce deuxième mode opératoire que nous proposerons pour doser en clinique la bilirubine dans le méconium et dans les selles des nourrissons.

D. — Application de notre méthode au dosage de la bilirubine dans le suc duodénal.

Le tubage duodénal suivi de l'épreuve de Meltzer-Lyon est devenu le meilleur moyen d'exploration fonctionnelle du foie et des voies biliaires; dans les diverses biles (A, B, C) recueillies successivement, le dosage des pigments biliaires est pratiqué de façon courante; et nous avons eu bien des fois l'occasion de le réaliser durant nos stages hospitaliers d'internat. Aussi avons-nous cherché à transposer notre méthode coprologique en l'appliquant au dosage de la bilirubine dans la

bile. Les résultats que nous avons obtenus nous paraissent satisfaisants; ils sont certainement plus précis que la plupart de ceux fournis par les techniques classiques usitées actuellement. Ces dernières sont, en effet, plutôt des évaluations approchées de la quantité de pigments traduites en unités définies arbitrairement que des dosages véritables (technique de Hijmans van den Berg, Chiray).

Voici la méthode de dosage que nous avons mise au point :

Principe. — Le pigment est extrait du suc duodénal par l'alcool ammoniacal, puis oxydé par le sulfate de cuivre et dosé au photocolorimètre électrique.

Technique. — Dans un tube à essais, mesurer exactement 2 cm³ de suc duodénal, 17,5 cm³ d'alcool ammoniacal. Agiter environ une minute. Ajouter 0,5 cm³ d'acide chlorhydrique pur et X gouttes du réactif oxydant. Il se développe une coloration verte immédiate. Filtrer sur papier dans un tube calibré. Doser, au bout de cinq minutes environ, la lumière transmise au photocolorimètre électrique, muni du filtre 520 M, avec l'alcool ammoniacal comme compensateur.

Calculs :

$$\frac{(2{,}204 \times \text{Log } G) \times 10}{K} = C \text{ mg. p. } 1.000.$$

où :

G = chiffre donné par la lecture du tambour;

K = constante déterminée par la bilirubine = 0,013.

Si G est inférieur à 20, prendre 1 cm³ de suc duodénal au lieu de 2 cm³ et multiplier le résultat final par 2.

Voici quelques résultats que nous avons obtenus comparativement à ceux donnés par la technique de Hijmans van den Berg et Chiray.

BILES		Technique H. van den Berg en mg. p. 1000	Technique personnelle en mg. p. 1000
I	A	20	30
	B	40	50
	C	22	25
II	A	15	20
	B	60	75
	C	20	25
III	A	15	21
	B	80	92
	C	24	28
IV	A	31	39
	B	45	53
	C	24	28
V	A	17	23
	B	67	78
	C	24	32

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail est avant tout d'ordre coprologique.

L'étude des pigments biliaires dans les matières fécales présente pour le clinicien une réelle importance. Nous avons été frappé de la complexité et de la difficulté des méthodes actuellement employées. La recherche très délicate de la bilirubine et de la stercobiline et leur dosage beaucoup trop long éloignent la plupart des praticiens de cette précieuse méthode d'investigation. Nous avons réussi à apporter deux méthodes nouvelles beaucoup plus simples et beaucoup plus rapides.

Une minutieuse bibliographie de la question nous a permis d'étudier la genèse des pigments biliaires dans l'organisme, la préparation, la constitution, la synthèse et les propriétés physico-chimiques de la bilirubine. Elle nous a permis en outre de présenter et de critiquer les procédés de recherche et de dosage actuellement employés.

Les procédés de recherche de ces pigments présentent l'inconvénient majeur de ne permettre la lecture des résultats qu'en milieu *trouble*.

Les dosages de la bilirubine, qui ne sont actuellement que très rarement employés en clinique, demandent *plusieurs heures* de manipulation.

Nos deux méthodes personnelles évitent ces deux inconvénients principaux.

Notre technique de recherche qualitative des pigments biliaires dans les selles est basée sur l'oxydation de la bilirubine et de la stercobiline par le sulfate de cuivre en milieu alcoolique. La lecture se fait en milieu *limpide* en fonction de la coloration du liquide extractif témoin.

Notre méthode de dosage est basée sur le principe suivant : extraction des pigments biliaires en présence de sulfate de sodium anhydre par l'alcool ammoniacal, oxydation par le sulfate de cuivre et dosage au photocolorimètre électrique. Elle donne en *quinze à vingt minutes* les résultats recherchés.

Nous avons étudié notre méthode de dosage de la bilirubine dans le méconium, les selles des nourrissons et aussi dans la bile, nous réservant d'appliquer ultérieurement cette technique au dosage de la stercobiline dans les selles d'adultes dès que la possibilité de nous procurer ce pigment nous sera offerte.

Nous avons l'espoir que notre travail pourra servir de base à l'étude systématique de l'élimination de la bilirubine chez le nourrisson en attendant de pouvoir obtenir un résultat parallèle vis-à-vis des pigments biliaires chez l'adulte.

Nous serions heureux si notre modeste contribution pouvait apporter quelque aide dans l'établissement du diagnostic clinique et dans la connaissance du métabolisme des pigments biliaires.

Vu, bon a imprimer :
Le Président,
R. SIGALAS.

Vu : *Le Doyen*,
Pierre MAURIAC.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 24 avril 1944.
L'Inspecteur général de l'Enseignement supérieur,
Recteur de l'Académie,
Pour le Recteur :
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
Pierre MAURIAC.

BIBLIOGRAPHIE

1. Deschiens (R.). — Action de la bilirubine et de la bile totale sur les amibes dysentériques. *C. R. Soc. biol.*, t. 129, p. 626, 1938.
2. Morhard (P.-E.). — La vitamine K et ses applications thérapeutiques. *Presse méd.*, 23-26 juill. 1941, n^{os} 64-65.
3. Hédon (E.) et Hédon (L.). — Précis de physiologie. Doin, 1939.
4. Chabrol (E.). — Pathologie du foie et des voies biliaires. Masson, 1941.
5. Florentin (P.). — Recherches expérimentales sur la biligénie pigmentaire normale et pathologique. Thèse médecine Nancy, 1924.
6. Lemberg (R.) et Wyndham (R. A.). — *J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales*, 70, 343-56, 1937.
7. — *Biochem. J.*, 30, 1147-1170, 1936.
8. Brulé (M.) et Spilliaert (M.). — Le passage des pigments biliaires dans l'intestin malgré l'arrêt du cours normal de la bile. *Annales de médecine*, mai 1921, n° 5.
9. Forsche (A. D.), Pike (E. F.) et Gabby (J. L.), *in* Polonovski (M.) et Lespagnol. — Introduction chimique à l'étude de la biologie générale. Masson, 1941.
10. Polonovski (M.) et Lespagnol. — Introduction clinique à l'étude de la biologie générale. Masson, 1941.
11. Fischer (H.). — *Hoppe Seyler's Zeitschrift f. physiol. chem.*, vol. 274, p. 231, 1942.

12. Fischer (H.). — *Ztschr. physiol. chem.*, 1911, 73, 204, *in* Grignard, Traité de chimie organique, t. XIX. Masson, 1942.

13. Varela. — *C. R. Soc. biol.* t. 117, 900-908, 1934.

14. Dhéré (Ch.). — La fluorescence en biochimie. Collection « Les problèmes biologiques », t. XXI. Presses universitaires, 1937.

15. Lemberg (R.). — *Biochem. J.*, 28, 278, 1934.

16. Gouzon (B.). — L'irradiation ultra-violette; son action sur les pigments. *Ann. de physiol. et de physico-chimie biol.*, 11, 388, 1935.

17. Boutaric (M.-A.) et Roy (M.). — Sur l'absorption des solutions de bilirubine dans le spectre visible. *Bull. Soc. chim. biol.*, t. XXV, n^{os} 1-3, p. 30, 1943.

18. Beer et Lambert. — *In* Précis de physique médicale C. Sigalas et Wangermez. Maloine, 1939.

19. Ehrlich. — *Zentralb. f. Klin. Med.*, IV, 721, 1883, n° 45.

20. Riegler. — *Wien. Klin. Blätter*, 1889, n° 2.

21. Krokiewicz et Batko. — *Münch. med. Woch.*, 1906, 52, 406.

22. Pröscher. — *Zentr. f. inn Med.*, t. 26, p. 169.

23. Orndorf et Teeple. — *Salkowski Vorschrift*, Berlin, Hirschfeld, 1904.

24. Hijmans van den Berg. — Der Gallenfarbstoff in blut. Monographie. Leipzig, 1918.

25. Zins. — *Klin. Woch.*, 1923, 978.

26. Hoesch. — *D. Arch. Klin. Med.*, 1923, 142, 1930; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

27. Hunter (G.). — *Can. Med. Assoc. Journ.*, 1930, 23, 823.

28. Jegorov (K.). — *Chem. Zent.*, 1931, 1, 3030; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

29. Godfried. — *Biochem. J.*, 1934, 28, 2056.

30. May (C. E.), Martindale (R.) et Boyd (W. F.). — *J. Biol. Chem.*, 104, 255-257, 1934.

31. With (T. K.). — Méthode de recherche quantitative de la bilirubine dans les selles. *Ztschr. Physiol. Chem.*, 275, 166, 175, 27, 8, 42.

32. Herzfeld. — *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1912, 77, 280; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

33. Lachaux. — Contribution à l'étude des éliminations urinaires par la méthode du relargage. Thèse pharmacie, Paris, 1938.

34. Fischer (H.) et Haberland (H. W.). — *Ztschr. Physiol. Chem.*, 232 (236-258), 1935.

35. Gmelin. — Cf. Tiedemann et Gmelin, Die Verdanung nach versuchen. Liepzig und Heidelberg, I, p. 80, 1826.

36. Rosenbach. — *Zentr. f. d. Med.*, Wissen, 1876, 5.

37. Dragendorff. — *Z. anal. chem.*, t. 25, p. 459.

38. Presslich. — *Münch. Med. Woch.*, 1905, 52, 220; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

39. Naumann (H. N.). — *Biochem. J.*, 30 (762-764), 1936.

40. Brucke. — *J. prak. chem.*, 1877, p. 22, ou *Chem. Zentr.*, 1859, 248; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

41. Fleischl. — *Z. anal. chem.*, t. 5, p. 502.

42. Vitali. — *Anna. chim. appl. Medicina*, 1873, 57, 278.

43. Ultzmann. — *Wiener med. Presse*, 1877, n° 32.

44. Masset. — Répertoire de pharmacie, 1879, 7, 2e série, 58.

45. Klehbiel. — *Viener med. Woch.*, 1883, n° 10.

46. Gilbert, Herscher et Posternack. — *C. R. biol.*, 1903, 55, 530, 1587.

47. Steensma. — *Biochem. Ztschr.*, 1906, 8, 209.

48 Spalitta. — *Zentr. f. Physiol.*, 1904, 4, 91.

49. Glass (J.). — *Mediz. Welt.*, 1929, 3, 824, *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

50. Dhéré. — *C. R. Soc. biol.* 1930, 103, 371.

51. Denigès (G.), Chelle (L.) et Labat (A.). — Précis de chimie analytique. Maloine, 1931.

52. Halberkann et Reicke. — *Die mediz. welt*, 1933, 2, 265, *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

53. Rosenbach. — *Dtsch. med. Woch.*, 1892, n° 17.

54. Biffi. — *Gazetta degli ospedali*, 1901, n° 18.

55. Trousseau et Dumontpallier. — *L'Union médicale*, 1863, n° 39.

56. Maréchal. — *Semaines médicales*, 11 février 1893.

57. Smith (W. G.). — *Dublin Journ. of med. Sciences*, 1876, p. 449.
58. Kathrein. — *Chem. Zentr.*, 1891, p. 27.
59. Rosin (H. Z.). — *Anal. chem.*, 1893, 32, 515.
60. Le Nobel. — *Zentr. f. Klin. Med.*, 1890, n° 4.
61. Obermayer et Popper. — *Wiener Klin. Woch.*, 1908, 25, 895.
62. Jolles. — *Ztschr. Physiol. chem.*, 1899, 27, 83, ou *Z. anal. chem.*, 1903, 42, 713.
63. Aucké. — In Denigès (G.), Chelle (L.) et Labat (A.), Précis de chimie analytique. Maloine, 1931, t. II.
64. Capranica. — *Moleschotts unters. Z. Naturlehre*, n° 13, p. 190.
65. Maly. — Handbuch der physiol. de Hermann, V, 167, 1881; *in* Dhéré, Les problèmes biologiques, t. XXI, 1937.
66. Hugounenq. — *C. R. Soc. biol.*, 1901, 132, 91.
67. Schmidt (C. R.), Jones (K. K.) et Ivy (A. C.). — *Proc. Soc. exp. biol. med.*, 34, 17, 1936.
68. Guerra. — Ac. med. di Torino, 1900; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.
69. Piettre. — *C. R. Soc. biol.*, 1909, 1, 48, 1213.
70. Fouchet. — *J. Pharm. chim.*, 1918, 18, 19.
71. Grigaut. — Sur la recherche de l'urobiline et de la bilirubine dans les fèces par l'oxydation directe. *C. R. Soc. biol.*, Paris, 1913, LXXXIV, 265-267.
72. Triboulet. — Méthode d'examen rapide des selles de nourrissons et d'enfants. *J. méd. de Paris*, 1909, 2e S., 284-287.
73. Seide (J.) et Zink (K.). — *Deutsche med. Woch.*, t. 57, p. 1744, 10, 1931.
74. Balatre (P.). — *J. Pharm. chim.*, 22, 166, 1935.
75. Strani (M.). — Diagnostica tec. lab., 8, 721, 8, 1937.
76. Kuhn (Ch.). — *J. Pharm. chim.*, t. 8, p. 546-549, 1928.
77. Adler et Meyer (E.). — *Klin. Woch.*, 1923, 258.
78. Maslow. — *Ztschr. Physiol. chem.*, 1911, 74, 297.
79. Sternberg (H.). — *Biochem. Ztschr.*, 1926, 171, 217.
80. Malloy (H. T.) et Evelyn (K. A.). — *J. biol. chem.*, 122 (597-603), 1938.
81. Piettre. — *C. R. Soc. biol.*, 1908, 147, 1492.

82. Maly. — *Ann.*, 1845, 53, 277; *in* Lachaux, thèse pharmacie, Paris, 1938.

83. Adlesberg (D.) et Porges (O.). — De la caractérisation de la bilirubine et de l'urobiline dans les matières fécales par l'acide trichloracétique. *Biochem. Ztschr.*, 1924, n° 150, S. 348.

84. Hammarsten. — Lehrbuch der physiol. chem., 1889.

85. Fischer (H.) et Haberland (H. W.). — *Ztschr. Physiol. chem.*, 232, 236-58, 1935.

86. Fischer (H.). et Meyer-Betz. — *Ztschr. Physiol. chem.*, 1911, 75, 232.

87. Fischer (H.) et Haberland (H. W.). — *Ztschr. Physiol. chem.*, 232, 236, 1935.

88. Fischer. — *Zsthr. f. biol.*, 65, 167, 1914.

89. Barac. — *Bull. Soc. chim. biol.*, 21, 1163, 1939.

90. Peterman (E. A.). — U. S., 2, 049, 134, July 28.

91. Morel et Policard. — *In* Fiessinger (N.), Olivier (H. R.) et Herbain (M.), Les diagnostics biologiques. Maloine, 1938.

92. Jaffé (M.). — *Wirchovs Archiv. f. pathol. Anatom.*, 47, p. 405, 1869.

93. Goiffon (R.). — Manuel de coprologie clinique. Masson, 1942.

94. Fiessinger (N.), Olivier (H.-R.) et Herbain (M.). — Les diagnostics biologiques. Maloine, 1938.

95. Maillard (L.-C.), *in* Grigaut. — *C. R. Soc. biol.*, Paris, 1913. LXXXIV, 265,267.

96. Heilmeyer (L.). — *Biochem. Ztschr.*, 296 (383-388), 1938.

97. Grimbert. — Recherche des pigments biliaires dnas l'urine. *Journ. de pharm. et de chimie*, p. 487, 1905.

98. Vogl et Zins. — *Med. Klinik*, 1922, n° 21, S. 653.

99. Bertrand (G.) et de Saint-Rat (L.). — *C. R. Soc. biol.*, 203, 140, 1936.

100. Ylppö (A.). — *Zertschrift f. Kinderhk*, 9, 208, 1913.

101. König-Martens et Grühbaum. — *Annalen d. Physik.*, 4, F. 12, S. 984, 1903.

102. Meyer et Alder. — De la variation de la bilirubine chez les nouveau-nés. *Zdl. Gynäk.*, 48, p. 1514, 1924.

103. Peterman (E. A.) et Cooley (E. B.). — *J. Lab. and. clin. med.*, 19, 723-724, 1933.

104. Sribhishaj (K.), Hawikins (W. B.) et Wipple (G. H.). — *Ann. J. physiol.*, 96, 449, 1931.

105. Evelyn (K. A.). — *J. biol. Chem.*, 115, 63, 1936.

106. Brulé et Garban (N.). — Sur les procédés d'extraction de la stercobiline. *C. R. Soc. de biol.*, 20 mars 1920, n° 10.

107. Auché. — Sur un spectre caractéristique des pigments biliaires. *C. R. Soc. de biol.*, 64, 299, 1908.

TABLE DES MATIERES

Pages

AVANT-PROPOS 11

INTRODUCTION 13

CHAPITRE I. — **La bilirubine** 16

A. *Genèse* 17
B. *Préparation* 21
C. *Constitution* 21
D. *Synthèse* 26
E. *Propriétés physiques* 29
F. *Propriétés chimiques* 34

CHAPITRE II. — **Recherche qualitative des pigments biliaires dans les selles** 40

A. *Méthodes successivement proposées* 40
I. Réaction de la fluorescence aux sels de zinc. Technique de Morel et Policard 40
II. Réaction au sublimé. Technique de Goiffon 41
III. Réaction au sublimé acétique. Technique de Triboulet 42
IV. Réaction au perchlorure de fer. Technique de Grigaut 44
V. Réaction à l'acide trichloracétique. Méthode de D. Adlesberg et O. Porges 45
B. *Méthode personnelle* 46
C. *Application à la recherche de la bilirubine dans les liquides organiques* 51

CHAPITRE III. — **Recherche quantitative des pigments biliaires dans le méconium et les selles de nourrissons** 52

A. *Méthodes successivement proposées* 52
I. Méthode spectrophotométrique simple. Méthode de Ylppö 52

Pages

II. Méthodes par azoréaction :

a) Méthode de Meyer et Alder 54

b) Méthode de T. K. With 56

III. Méthode par oxydation 59

Méthode de H. T. Malloy et K. A. Evelyn 59

B. *Remarques préliminaires sur l'étude spectro-photométrique de la bilirubine* 67

C. *Méthode personnelle* 71

Technique I 72

Technique II 73

D. *Application de notre méthode au dosage de la bilirubine dans le sac duodénal* 76

Conclusions générales 79

Bibliographie 81

Dépôt légal effectué en 1943 (2e trimestre). Loi du 21 juin 1943.

22340. — Imprimeries Delmas, Bordeaux. 31.0192. — 1944.